

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



***Implementação e validação de uma metodologia para a
detecção e quantificação de substâncias explosivas
inorgânicas***

Beatriz Tavares da Silva Flores Brasil

Dissertação

Mestrado em Química

Química Analítica

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



***Implementação e validação de uma metodologia para a
detecção e quantificação de substâncias explosivas
inorgânicas***

Beatriz Tavares da Silva Flores Brasil

Dissertação orientada por

Prof. Doutor Ricardo Bettencourt da Silva e

Mestre Pedro Alexandre dos Santos Salgueiro

Mestrado em Química

Química Analítica

2012

Agradecimentos

Ao Mestre Pedro Salgueiro e ao Prof. Doutor Ricardo Bettencourt da Silva por toda a dedicação e orientação prestada ao longo destes meses, assim como por todo o conhecimento transmitido e disponibilidade para me ajudar sempre que necessário.

À Dr^a Sandra Santos pela forma como me recebeu no LPC e por toda a simpatia e disponibilidade para me ajudar que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Maria Filomena Camões por todo o conhecimento transmitido e ajuda prestada ao longo destes dois anos.

Aos meus pais que sempre apoiaram e incentivaram as minhas decisões durante o meu percurso académico.

Por fim, a todos os meus amigos que me acompanharam durante estes anos e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

Resumo

Muitos têm sido os tipos de explosivos usados por organizações terroristas, no entanto, o número de ataques recorrendo a explosivos improvisados (IEDs) tem vindo a aumentar. Na maioria dos casos estes são explosivos inorgânicos produzidos usando materiais disponíveis comercialmente e/ou explosivos militares, levando à necessidade de recorrer a técnicas analíticas capazes de proceder à sua identificação.

O trabalho desenvolvido consistiu na optimização e validação da identificação de explosivos inorgânicos, suportada no balanço iónico da fracção solúvel em água. Este balanço baseia-se na quantificação da composição iónica de extractos aquosos de explosivos por cromatografia iónica (IC). O balanço de aniões e catiões é realizado considerando a incerteza das determinações através do estudo de compatibilidade metrológica das concentrações molar de cargas positivas e negativas.

A qualidade dos resultados obtidos em rotina é garantida pela aplicação de um programa de controlo da qualidade interno, realizado através da análise de padrões de controlo (PC) equivalentes aos de calibração, e através de um estudo de compatibilidade entre o teor estimado e o esperado do PC baseado nas respectivas incertezas.

Os métodos e os critérios de controlo da qualidade desenvolvidos foram testados pela análise de amostras reais.

Foi possível concluir que o procedimento proposto assegura a qualidade dos resultados obtidos, permitindo conhecer a proporção dos analitos presentes na amostra sólida de explosivos e, desse modo, identificar o material em causa, tornando-se assim numa mais valia para este tipo de análise. Esta informação pode ser complementada com o resultado de outras ferramentas analíticas.

Palavras chave: explosivos inorgânicos, validação, controlo da qualidade, incerteza, balanço iónico, IC.

Abstract

Many types of explosives have been used by terrorist organizations, however, the number of attacks using improvised explosives (IED) is increasing. In most cases, IEDs are inorganic explosives produced using commercially available materials and/or military explosives, leading to the need for analytical techniques able to identify these materials.

This work consists in the optimization and validation of the identification of inorganic explosives, supported on the ionic balance of the water soluble fraction. This balance is based on the quantification of the ionic composition of the aqueous extracts of explosives by ion chromatography (IC). The charge balance of anions and cations is performed considering the uncertainty of the determinations through the assessment of the metrological compatibility of molar concentrations of negative and positive charges.

The quality of routine measurement is checked by applying an internal quality control plan based on the analysis of control standards (CS) equivalent to calibration ones, involving the assessment of the compatibility between estimated and expected concentrations of CS considering the respective uncertainties.

The measurement procedure and quality control strategy were tested in the analysis of real samples.

The proposed procedure ensures the quality of the obtained results through the reliable estimation of the proportion of the species presents in the solid sample of explosive and by this means identifying the material. This information can be complemented with the results of other analytical tolls.

Keywords: Inorganic explosives, validation, quality control, uncertainty, ionic balance, IC.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANFO	Explosivo à base de combustível e nitrato de amónio
ANOVA	Análise de variâncias
ASS	Espectroscopia absorção atómica
Cal.	Componente da calibração
CE	Electroforese capilar
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
IC	Cromatografia iónica
IEDs	Engenhos explosivos improvisados
LD	Limite de detecção
LPC	Laboratório de Polícia Científica
LQ	Limite de quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Espectrometria de massa
NC	Nitrocelulose
P _{Velho}	Padrão de calibração armazenado durante dois meses usado no teste da estabilidade dos padrões
P _{Novo}	Padrão da curva de calibração preparado de fresco usado no teste de estabilidade dos padrões
PC	Padrão de controlo
PC1	Padrão de controlo com concentração correspondente ao padrão mais baixo da curva de calibração
PC2	Padrão de controlo com concentração correspondente ao padrão mais alto da curva de calibração
Rep.	Componente da Repetibilidade
RDX	Ciclo-1,3,5-trimetileno-2,4,5-trinitramina
SEM/EDS	Microscopia electrónica de varrimento com dispersão de raios-X
Temp.	Componente da temperatura
TNT	2,4,6-trinitrotolueno

Tol.	Componente da tolerância
UV-Vis	Ultravioleta visível
XRD	Difracção de raios-X
XRF	Fluorescência de raios-X
μ	Média de uma população de valores
σ	Desvio padrão de uma população de valores
ΔT	Variação de temperatura, numa solução medida por volumetria, em torno da temperatura de referência da calibração do material volumétrico.
χ^2	Teste Qui-quadrado
a	Ordenada na origem da regressão linear não ponderado
a_w	Ordenada na origem da regressão linear ponderada
b	Declive da regressão linear não ponderado
b_w	Declive da regressão linear ponderada
c_i	Concentração do padrão de calibração associada ao nível i
C_o	Concentração de um item desconhecido obtido por interpolação na curva de calibração
$C_{MRCEstimada}$	Concentração de uma espécie no MRC estimada por interpolação numa curva de calibração.
$C_{MRCEsperada}$	Concentração de uma espécie esperada no MRC
C_{PCPrep}	Concentração esperada do padrão de controlo
E	Coeficiente de expansão térmica
F_v	Factor de diluição
k	Factor de expansão
k'	Factor de capacidade
N	Número de pratos teóricos de uma coluna
n	Número de pontos experimentais da recta de calibração
m	Número de replicados de leitura da amostra
p	Níveis de concentração
r	Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis x e y
r	Limite de repetibilidade
\mathfrak{R}	Desvio padrão relativo expresso em percentagem

s	Desvio padrão de uma amostra de valores
s^2	Variância de uma amostra de valores
s_i	Desvio padrão associado aos sinais instrumentais de leituras replicadas de padrões de calibração ao nível de concentração i
s_{rep}	Desvio padrão da repetibilidade
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual estimado pelo modelo linear não ponderado
$S_{(y/x)w}$	Desvio padrão residual estimado pelo modelo linear ponderado
S_{x_0}	Desvio padrão de interpolação associado a x_0 estimado pelo modelo de regressão não ponderado
$S_{x_{0w}}$	Desvio padrão de interpolação associado a x_0 estimado pelo modelo de regressão ponderado
$S_{20\text{mL}}$	Desvio padrão de dez medições feitas com a pipeta de 20 mL em condições de repetibilidade
$S_{20-200\mu\text{L}}$	Desvio padrão de dez medições feitas com a micropipeta de 20-200 μL em condições de repetibilidade
t_R	Tempo de retenção de um composto
t_R'	Tempo de retenção ajustado ou tempo na fase estacionária
t_0	Tempo morto ou tempo na fase móvel
u_x	Incerteza padrão associada à variável x
U_x	Incerteza expandida associada à variável x
$u_{tol\ 5\text{mL}}$	Incerteza padrão associada à calibração da pipeta de 5 mL
$u_{MRCEstimada}$	Incerteza padrão associada ao teor estimado de uma espécie no MRC
$u_{MRCEsperada}$	Incerteza padrão associada ao teor esperado de uma espécie no MRC
u_{F_v}	Incerteza padrão associada ao factor de diluição F_v
u_m	Incerteza padrão associada a m
u_{bal}^{cal}	Incerteza padrão associada a m devido à calibração da balança
u_{bal}^{rep}	Incerteza padrão associada a m devido à repetibilidade da balança
u_{MSal}	Incerteza padrão associada à massa molar do sal
u_V	Incerteza padrão associada a V

u_V^{cal}	Incerteza padrão associada ao volume V devido à calibração do material volumétrico
u_V^{rep}	Incerteza padrão associada ao volume V devido à repetibilidade do material volumétrico.
u_V^{temp}	Incerteza padrão associada ao volume V devido ao efeito da temperatura
$u_{V1:2}$	Incerteza padrão associada a uma diluição V_1+V_2
$u'_{Mãe}$	Incerteza padrão relativa associada à concentração de uma solução mãe comercial
$u'_{Mião}$	Incerteza padrão relativa associada à massa molar do ião
$u'_{PCP_{rep}}$	Incerteza padrão relativa associada ao teor esperado do padrão de controlo
u'_{Pureza}	Incerteza padrão relativa associada à pureza de um sólido
u'_{x_0}	Incerteza padrão relativa associada a x_0 .
V	Volume medido
x_0	Teor de um item desconhecido estimado por interpolação de uma curva de calibração
\bar{x}	Média de uma amostra de valores
\bar{x}_w	Média ponderada dos teores dos padrões de calibração
\hat{y}_i	Sinal instrumental associado ao teor de analito x_i estimado pela recta de regressão
y_0	Sinal instrumental produzido pela leitura de um item desconhecido
\bar{y}	Média de uma amostra de valores de y
\bar{y}_w	Média ponderada dos sinais produzidos pela leitura dos padrões de calibração
w_i	Factor de ponderação associado ao nível de calibração de índice i
w_0	Factor de ponderação associado ao sinal instrumental da leitura de um item desconhecido

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Lista de símbolos e abreviaturas	VII
Índice Geral	XI
Índice de Tabelas	XIII
Índice de Figuras	XVII
1. Introdução	1
1.1 Explosivos	3
1.1.1 Propriedades dos explosivos	4
1.1.2 Classificação de explosivos	5
1.1.3 Análise de explosivos inorgânicos	7
1.2 Método de análise	9
1.2.1 Cromatografia	9
1.2.2 Teoria da Cromatografia	9
1.2.3 Cromatografia iónica	12
1.3 Validação de Métodos Analíticos	14
1.3.1 Validação do desempenho qualitativo	15
1.3.2 Validação do desempenho quantitativo	15
1.3.2.1 Linearidade e gama de trabalho	15
1.3.2.2 Precisão	21
1.3.2.3 Exactidão	22
1.3.2.4 Limiares analíticos	22
1.3.3 Incerteza da medição	23
2. Parte Experimental	25
2.1 Reagentes	25
2.2 Material e Equipamento	26
2.3 Procedimento Experimental	26
2.3.1 Análise de catiões	26
2.3.1.1 Condições experimentais	27

2.3.1.2	Padrões usados na validação dos métodos para a análise de catiões	28
2.3.2	Análise de aniões	31
2.3.2.1	Condições experimentais	31
2.3.2.2	Padrões usados na validação dos métodos para a análise de aniões	32
2.4	Análise de materiais de referência certificados	34
2.5	Extracção de amostras reais	35
3.	Resultados	39
3.1	Validação do Desempenho Qualitativo	39
3.1.1	Estratégia de validação	39
3.2	Validação do Desempenho Quantitativo	41
3.2.1	Estratégia de validação	41
3.2.2	Linearidade e gama de trabalho	41
3.2.3	Limiares analíticos	45
3.2.4	Estudo da estabilidade da curva	47
3.2.5	Estudo da estabilidade dos padrões	55
3.2.6	Determinação do factor de ponderação em rotina	57
3.2.7	Avaliação do desempenho de calibrações diárias realizadas com um ou dois replicados	60
3.2.8	Incerteza associada à medição da composição iónica de extractos aquosos de explosivos	63
3.3	Análise de Materiais de Referência Certificado	71
3.4	Controlo da Qualidade	72
3.4.1	Análise qualitativa	73
3.4.2	Análise quantitativa	74
3.5	Análise de Amostras Reais	75
3.5.1	Análise qualitativa	76
3.5.2	Análise quantitativa-balanço iónico	77
4.	Conclusões	85
5.	Referências bibliográficas	87
6.	Anexos	

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1	Condições experimentais usadas na análise qualitativa e quantitativa dos catiões.	28
Tabela 2	Massas pesadas para a preparação das soluções mãe e respectivas concentrações.	29
Tabela 3	Tomas a tirar das soluções mãe para a preparação de 100 mL dos padrões das curvas de calibração dos catiões.	30
Tabela 4	Tomas tiradas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação de 10 mL dos PC usados na validação do procedimento de análise qualitativa dos catiões.	30
Tabela 5	Condições experimentais usadas na análise qualitativa e quantitativa dos aniões.	32
Tabela 6	Massas pesadas para a preparação das soluções mãe do clorato e do carbonato.	32
Tabela 7	Tomas tiradas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação de 100 mL dos padrões da curva combinada dos aniões.	33
Tabela 8	Tomas retiradas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação dos PC usados na validação das medições qualitativas dos aniões.	34
Tabela 9	Descrição das amostras reais analisadas neste trabalho e diluições feitas para a análise quantitativa dos aniões e dos catiões.	37

Capítulo 3

Tabela 10	Limites de repetibilidade obtidos para os tempos de retenção dos catiões.	40
Tabela 11	Limites de repetibilidade obtidos para os tempos de retenção dos aniões.	40
Tabela 12	Gama de trabalho escolhida para os catiões.	42
Tabela 13	Gama de trabalho escolhida para os aniões.	42

Tabela 14	Resultados obtidos para o teste F realizado às variâncias obtidas nas dez primeiras leituras do primeiro e último padrão da curva combinada dos catiões e da curva do bário.	44
Tabela 15	Resultados obtidos para o teste F realizado às variâncias obtidas nas dez primeiras leituras do primeiro e último padrão da curva combinada dos aniões.	45
Tabela 16	Desvio padrão e médias obtidas para os dez replicados lidos para cada um dos catiões e os respectivos limiares analíticos.	46
Tabela 17	Desvio padrão e médias obtidas para os dez replicados lidos para cada um dos aniões e os respectivos limiares analíticos.	46
Tabela 18	Incerteza padrão relativa máxima associada à razão da concentração dos padrões de calibração do lítio, repetibilidade relativa mínima associada à resposta instrumental e resultado do teste F entre ambas.	48
Tabela 19	Sinais instrumentais do lítio obtidos nos quatro replicados da primeira leitura da curva combinada dos catiões.	50
Tabela 20	Valores dos factores de ponderação w_i associados a cada x_i e cálculos intermédios necessários para a determinação da ordenada na origem e declives ponderados e respectivos valores obtidos.	51
Tabela 21	Sinais obtidos para a leitura dos primeiros PC lidos durante a validação e a respectiva concentração obtida por interpolação.	51
Tabela 22	Incerteza padrão relativa, u'_{x0} , associada ao teor estimado de lítio no PC e respectivas componentes de incerteza.	52
Tabela 23	Dados necessários para o cálculo da concentração esperada dos PC e os respectivos resultados.	52
Tabela 24	Incerteza padrão relativa, $u'_{CPCPrep}$, associada ao teor de lítio do PC estimado pela sua preparação e respectivas componentes de incerteza.	52
Tabela 25	Resultados obtidos para o estudo de estabilidade feito com o primeiro PC lido durante a validação, dez dias após a leitura da curva combinada dos catiões.	53
Tabela 26	Resultados obtidos para o estudo de estabilidade feito com o primeiro PC lido durante a validação dos aniões.	54
Tabela 27	Resultados do teste F , aplicado às variâncias e do teste t , aplicado às médias das dez leituras dos dois padrões de catiões usados no estudo de estabilidade das soluções.	56
Tabela 28	Resultados do teste F aplicado às variâncias, e do teste t , aplicado às médias das dez leituras dos dois padrões dos aniões.	57

Tabela 29	Relação entre o desvio padrão absoluto, s , ou relativo, s' , e a concentração para os vários analitos em estudo e equações da recta nos casos onde se verificar uma relação linear.	58
Tabela 30	Sinais de leituras replicadas de padrões de calibração de lítio.	60
Tabela 31	Factores de ponderação determinados e cálculos intermédios para o cálculo dos parâmetros de regressão ponderados, com sinais únicos, e respectivos valores obtidos considerando uma curva de calibração.	61
Tabela 32	Factores de ponderação determinados e cálculos intermédios para o cálculo dos parâmetros de regressão ponderados, com sinais duplicados, e respectivos valores obtidos considerado uma curva de calibração do lítio	61
Tabela 33	Sinais e teores estimados dos padrões de controlo de lítio, com a respectiva incerteza de interpolação, considerando calibrações baseadas em leituras únicas e duplicadas dos padrões de calibração.	62
Tabela 34	Resultados obtidos para o estudo de compatibilidade dos teores estimados e esperados de padrões de controlo de lítio com base em calibrações obtidas de sinais únicos (1 rep) e sinais duplicados (2 rep) dos padrões de calibração.	62
Tabela 35	Incertezas padrão relativas associadas à pureza do Sal, à sua massa molar e à pesagem.	66
Tabela 36	Incerteza padrão relativa associada ao volume da solução padrão mãe.	67
Tabela 37	Incertezas padrão relativas associadas à concentração da solução mãe, à diluição desta e à massa molar do ião.	70
Tabela 38	Resultados da determinação do teor de aniões no MRC e respectiva incerteza padrão.	71
Tabela 39	Resultados da determinação do teor de catiões no MRC e respectiva incerteza padrão.	72
Tabela 40	Tempo de retenção de aniões identificados nas amostras e critério de identificação dos analitos.	77

Tabela 41 Tempo de retenção de catiões identificados nas amostras e critério de identificação dos analitos. 77

Tabela 42 Resultados obtidos na leitura da curva diária, factores de ponderação associados a cada x_i e cálculos intermédios necessários à determinação dos parâmetros da curva ponderada. 78

Tabela 43 Parâmetros de regressão ponderados da curva diária, sinal instrumental obtido para a amostra e a concentração estimada por interpolação desse mesmo sinal na curva determinada. 79

Tabela 44 Resultados obtidos na análise quantitativa das amostras e a incerteza padrão associada à medição. 81

Tabela 45 Percentagens de moles de cargas associadas a cada analito presente nas amostras em estudo, acompanhadas pela respectiva incerteza padrão. 82

Índice de Figuras

Capítulo 1

- Fig.1** Exemplo de um cromatograma típico e representação gráfica dos parâmetros t_M e t_R . 10
- Fig.2** Representação da preparação de uma resina de estireno-divinilbenzeno. 12
- Fig.3** Representação dos empacotamento das resinas de permuta iônica. 12
- Fig.4** Representação esquemática dos componentes básicos de um cromatógrafo iônico sem supressor. 13
- Fig.5.** Representação da Curva de Gauss. 17
- Fig.6** Esquema com as etapas a seguir para o cálculo da incerteza associada a uma medição. 23

Capítulo 2

- Fig.7** Cromatógrafo iônico usado neste trabalho . 26
- Fig.8** Esquema de preparação das curvas de calibração combinada e do bário usadas na validação do desempenho quantitativo dos método. 29
- Fig.9** Esquema de preparação da curva de calibração combinada usada na validação do procedimento quantitativo dos aniões. 33
- Fig.10** Representação esquemática de todos os passos pelos quais as amostras têm de passar desde que chegam ao LPC até à determinação cromatográfica. 35

Capítulo 3

- Fig.11** Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível de concentração da gama de trabalho dos catiões, onde temos por ordem crescente de tempo de retenção o Lítio, Sódio, Amônio, Potássio, Cálcio, Magnésio e Estrôncio. 42
- Fig.12** Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível de concentração da gama de trabalho do Bário. 43
- Fig.13** Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível de concentração da gama de trabalho dos aniões onde temos por ordem crescente de tempo de retenção Fluoreto, Cloreto, Nitrito, Brometo, Nitrato, Clorato e Sulfato. 43
- Fig.14** Esquema geral de preparação dos padrões da curva de calibração e dos PC. 47

Fig.15 Esquema de preparação e material volumétrico usado na preparação da curva de calibração e dos PC.	50
Fig.16 Esquema de injeção usado para testar a qualidade de calibrações realizadas com leituras únicas ou duplicadas dos padrões de calibração.	60
Fig.17 Diagrama causa efeito no caso em que os padrões da curva são preparados com base nas soluções mãe preparadas a partir dos respectivos sais.	64
Fig.18 Diagrama causa efeito no caso em que os padrões da curva são preparados com base em soluções padrão comerciais.	69
Fig.19 Esquema proposto para a análise qualitativa de amostras desconhecidas.	73
Fig.20 Esquema proposto para a análise quantitativa de amostras desconhecidas.	74
Fig.21 Esquema proposto para a análise de amostras desconhecidas em rotina.	75
Fig.22. Representação gráfica das percentagens de moles de cargas associadas a cada espécie constituintes das amostras em estudo.	82

1 INTRODUÇÃO

O aumento do uso de explosivos por parte de organizações terroristas levou a um crescimento do nível de insegurança na sociedade, sendo essencial serem tomadas medidas que combatam este crime e garantam a segurança e qualidade de vida das populações. Um dos passos mais importantes para serem alcançados estes objectivos é a identificação da origem e do respectivo culpado de modo a evitar crimes futuros. É nesse âmbito que a química forense tem extrema importância, pois cada vez mais, e como a ajuda de diversas técnicas analíticas, tem sido possível fornecer informação útil à investigação criminal. A identificação forense de explosivos tem merecido um considerável interesse por parte dos peritos desta área, pois identificar explosivos desconhecidos não consumidos é um desafio que requer a habilidade de detectar e quantificar um vasto número de materiais orgânicos e inorgânicos. (Dicinoski, 2006)

Embora este tipo de materiais contribuam bastante para a destruição de milhares de vidas humanas, os explosivos, têm também grande aplicabilidade na execução de grandes obras de engenharia as quais não seriam física e/ou economicamente possíveis sem o uso deste tipo de substâncias. As suas aplicações são as mais diversas desde obras de construção civil e aplicações industriais ou militares. O tipo de explosivos para o qual o público está mais familiarizado são os altos explosivos como é o caso do RDX (ciclo-1,3,5-trimetileno-2,4,5-trinitramina), o TNT (2,4,6-trinitrotolueno) e as suas variantes, e a NC (nitrocelulose), muitas vezes usados no terrorismo. No entanto, estes altos explosivos, baseados em compostos orgânicos instáveis, são difíceis de obter devido ao seu preço e à elevada regulamentação que lhes é imposta. Por outro lado, estão os explosivos inorgânicos improvisados, compostos à base de sais e peróxidos, que podem ser produzidos a baixo custo e com ingredientes de fácil acesso e venda livre, tornando-se assim numa excelente alternativa para as organizações terroristas. Isso é ilustrado pelo seu uso em alguns incidentes reportados mundialmente, como o caso dos recentes ataques em transportes públicos ocorridos em Madrid (2004) e Londres (2005). Deste modo, a identificação deste tipo de explosivo torna-

se de extrema importância para as autoridades que combatem o terrorismo. (Johns, 2008; Dicinoski, 2006; Hutchinson, 2008)

A análise de explosivos pode ser dividida em duas subáreas: a pré-explosão (antes da detonação) e a pós-explosão (depois da detonação). No primeiro caso, o explosivo apresenta-se intacto pelo que a observação macroscópica dos diversos componentes e identificação/quantificação química das espécies presentes na amostra, permite-nos conhecer qual o tipo de engenho usado. Por sua vez, a análise de resíduos de pós-explosão é mais complexa, sendo um dos grandes desafios da química forense. Neste caso, a análise química é efectuada após a detonação do explosivo, pelo que os resíduos recolhidos podem apresentar, para além dos compostos iniciais, produtos da reacção e contaminações ambientais. Quando isto acontece, a análise do explosivo original é feita assumindo que existem sempre partículas do explosivo inicial que não reagem, permitindo desta forma a sua identificação. (Yinon, 1993)

As amostras recolhidas podem ser pedaços de explosivo intacto, resíduos do local de explosão, ou esfregaços quando são recolhidas amostras de peças de roupa, de placas de aço, ferro, ou de outro tipo de superfícies onde o explosivo tenha detonado. A investigação criminal destes casos tem como objectivo identificar o explosivo usado, o seu modo de iniciação e a forma como este foi accionado com o intuito de ligar todas as evidências encontradas a um possível suspeito.

Na identificação de explosivos inorgânicos, as espécies iónicas constituintes são a evidência mais importante usada para a determinação da natureza destes explosivos. A grande diversidade de composições químicas nas amostras recolhidas obriga ao uso de métodos multi-analíticos capazes de quantificar diversos iões inorgânicos presentes de modo a identificar o explosivo inicial. (Meng, 2004; Johns, 2008; Byall, 2001)

Têm vindo a ser aplicadas várias técnicas neste campo de análise como é o caso da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massa (MS), microscopia electrónica de varrimento com dispersão de raios-X (SEM/EDS), espectroscopia absorção atómica (AAS), difracção de raios-X (XRD) e electroforese capilar (CE). No entanto, esta última juntamente com a cromatografia iónica (IC) revelaram-se as mais promissoras pois apresentam sensibilidade e selectividade suficientes para este fim. (Dicinoski, 2006; Hutchinson, 2008; McCord, 1994)

A IC permite não só uma análise qualitativa, onde podemos identificar as espécies iónicas presentes na amostra, como também a quantificação de cada uma delas. Nos últimos anos, a IC tem adquirido especial relevo nesta área e é aplicada na análise de uma variedade de explosivos inorgânicos compostos por constituintes solúveis em água. Entre eles estão as pólvoras, os compostos explosivos à base de nitrato de amónio, as emulsões explosivas, as misturas pirotécnicas e uma enorme variedade de explosivos improvisados. (Yinon, 1993; Beveridge, 1998)

1.1 Explosivos

Os explosivos, muitas vezes também denominados de materiais energéticos, são compostos instáveis que podem estar no estado líquido, sólido ou gasoso. São substâncias únicas ou mistura de substâncias químicas que têm a propriedade de ao serem iniciadas convenientemente sofrerem transformações químicas violentas e rápidas transformando-se em gases. Essas transformações resultam na libertação de grandes quantidades de energia sob a forma de calor, luz, som e pressão, num reduzido espaço de tempo. (STRIEE, 2007)

Os ingredientes principais de um explosivo são os combustíveis (como o gasóleo e o carbono) e os oxidantes (como é o caso do oxigénio). Quando o explosivo é iniciado, o combustível presente reage com o oxidante dando origem a um processo de combustão ou oxidação. (Dicinoski, 2006) A explosão é então uma forma de combustão violenta, que resulta da transformação súbita do material energético em gases a elevada temperatura e num curto espaço de tempo. Essa transformação resulta na produção de uma forte pressão que quando é convertida em trabalho mecânico provoca a ruptura do invólucro e a projecção de corpos em contacto. Se a explosão resultar da saída repentina de pressão quando num contentor fechado ocorre um aumento da mesma, é designada como explosão mecânica. Por outro lado, quando esta provém de uma reacção química ou mudança de estabilidade, que se efectua muito rápido gerando altas temperaturas e grandes quantidades de gás, estamos perante uma explosão química. (STRIEE, 2007)

As reacções químicas que ocorrem nos explosivos podem apresentar diversas velocidades de propagação levando a várias designações:

Combustão: As reacções de combustão caracterizam-se pela presença de chama e fumo. Não originam estampido pois os produtos gasosos e o calor formados dissipam-se no meio ambiente a uma velocidade reduzida quando comparada com os fenómenos seguintes.

Deflagração: É um processo de superfície rápido, que origina progressivamente um grande volume de gases a altas temperaturas e elevadas pressões, observando-se uma chama viva e um ruído. A sua propagação é feita à camada exterior de todas as partículas ao mesmo tempo e em cada partícula da periferia para o centro, por camadas concêntricas, com velocidade crescente e aumento de pressão.

Detonação: Consiste numa decomposição de moléculas da massa do explosivo. É uma reacção muito rápida que ocorre entre os átomos da mesma molécula. Normalmente é usado um detonador para fornecer a energia necessária para provocar um choque violento que desencadeie a propagação de uma onda explosiva através da massa do explosivo. A detonação pode ser dividida em baixa detonação quando o estímulo inicial só faz reagir parte do explosivo, ou alta detonação, quando toda a massa do explosivo reage originando gases e pressão a altas temperaturas. (STRIEE, 2007; Akhavan, 1998)

1.1.1 Propriedades dos explosivos

Os explosivos apresentam diversas propriedades que os caracterizam e que são importantes ser conhecidas quando estamos a lidar com este tipo de materiais. Destas destacam-se a estabilidade química, a potência explosiva, o calor de combustão, a temperatura de detonação e a velocidade de detonação.

A estabilidade de um explosivo está relacionada com a capacidade de este manter as suas características físico-químicas durante um determinado período de tempo. Esta propriedade é bastante afectada quando são desrespeitadas as condições de armazenamento.

A potência explosiva corresponde ao trabalho mecânico máximo que o explosivo poderia produzir se toda a sua energia térmica fosse transformada em trabalho.

O calor de combustão é o calor que é desenvolvido durante a decomposição química de um explosivo.

Por sua vez, a temperatura de detonação corresponde à temperatura máxima atingida pelos gases produzidos durante a decomposição do material energético.

Quanto à velocidade de detonação, esta corresponde à velocidade à qual se dá a decomposição do explosivo. (Martins, 1997; Ramalho, 2004)

1.1.2 Classificação de explosivos

A classificação de explosivos é um aspecto muito importante a ter em conta na análise destes tipo de material. É necessário conhecer o tipo de explosivo em causa e as suas propriedades de modo a ter conhecimento de quais os cuidados a ter no armazenamento, manuseamento e análise dos mesmos. Esta pode ser feita de acordo com a sua composição química, velocidade de reacção de decomposição, origem, sensibilidade e efeitos.

Composição química

Os explosivos podem ser substâncias únicas, quando se tratam de compostos constituídos por moléculas que isoladamente lhe conferem propriedades explosivas, ou misturas, quando estamos perante uma mistura de compostos que isoladamente não tem carácter explosivo. (Ramalho, 2004)

Velocidade de reacção de decomposição

Os explosivos podem ser classificados de acordo com a velocidade de decomposição em baixos e altos explosivos, sendo possível distinguir os últimos de acordo com o seu funcionamento dentro da cadeia de fogo em alto explosivo iniciador, reforçador, e principais ou de rotura.

Os baixos explosivos reagem com velocidades típicas entre os 0,3 m/s e 300 m/s e são normalmente usados para iniciar um alto explosivo. Diferem dos altos explosivos no modo de decomposição, pois simplesmente queimam ou deflagram, e o impulso inicial necessário é usualmente dado por uma chama. As pólvoras físicas (com fumo ou negras) ou químicas (sem fumo ou coloidais) são alguns exemplos deste tipo de materiais energéticos. (Yinon, 1993; STRIEE, 2007)

Relativamente aos altos explosivos, estes são menos sensíveis que os anteriores, apresentam uma velocidade de decomposição entre os 2000 m/s e 8500 m/s e a sua característica principal é a detonação. A sua iniciação pode ser feita de forma eléctrica,

mecânica, por acção de uma chama ou através de um baixo explosivo. (STRIEE, 2007) Os altos explosivos iniciadores são materiais muito sensíveis ao choque mecânico, ao calor e à fricção, e cuja principal função é fornecer a energia necessária a explosivos menos sensíveis. Normalmente são sais inorgânicos, que têm velocidades de detonação mais baixa e são menos estáveis do que aqueles que iniciam. Quanto aos altos explosivos reforçadores, como é o caso da pentrite, estes têm como função aumentar e sustentar a energia inicial potenciando a reacção de outros explosivos, sendo portanto usados em detonadores. Por fim, os altos explosivos principais ou de rotura são muito insensíveis ao choque e à chama. No entanto, quando são activados por um choque explosivo, como o provocado por um explosivo iniciador, decompõe-se com grande velocidade e libertando um grande volume de gases. São usados como cargas principais em minas, bombas e cargas de demolição. (Yinon, 1993; STRIEE, 2007)

Origem

Relativamente à sua origem, os explosivos podem ser classificados como militares, comerciais e improvisados. A principal aplicação dos explosivos militares, onde estão incluídos grande parte dos altos explosivos como o RDX e TNT, são as armas militares, enquanto os comerciais são muito usados em projectos de engenharia. As exigências requeridas a estas duas classes de explosivos são distintas, pelo que apresentam diferenças relativamente à estabilidade e sensibilidade. Estes explosivos podem ainda ser subdivididos consoante a sua estrutura em orgânicos e inorgânicos.

Outra classe dos explosivos são os improvisados. Estes também podem igualmente ser orgânicos ou inorgânicos, sendo os últimos cada vez mais usados pois os materiais necessários à sua produção são facilmente encontrados de forma legal, a baixo custo e prontos a utilizar. São produzidos à base de sais inorgânicos e/ou peróxidos e apesar de não disporem da estabilidade e sensibilidade dos anteriores, conseguem produzir uma potência e capacidade de trabalho assinaláveis. Têm sido cada vez mais usados por terroristas pois tem a vantagem de não deixar pistas fáceis de seguir, complicando assim a investigação criminal. Para a preparação deste tipo de explosivos são necessários apenas dois componentes principais: um oxidante que fornece o O_2 necessário à reacção e um combustível para alimentar a combustão. As características da mistura são definidas

consoantes as composições relativas dos componentes usados. (Meng, 2008; Tyrrel, 2011; STRIEE, 2007; Johns, 2008)

Sensibilidade

A sensibilidade de um explosivo relaciona-se com a quantidade de energia que será necessário fornecer para a sua activação. Os explosivos mais sensíveis podem ser activados por choque ou fornecendo uma determinada quantidade de calor. Por outro lado, quando se trata de um explosivo com uma sensibilidade mais baixa, é necessário recorrer-se à utilização de um detonador e por vezes reforçadores para a sua activação. (Daniel, 2000; Ramalho, 2004)

Efeitos

Quando se trata de um explosivo que apresenta uma velocidade de reacção que permite a destruição completa do meio envolvente, este é designado como explosivo fracturante. Por outro lado, quando a velocidade de reacção é mais lenta, o seu efeito é de ruptura por facturas existentes e estamos perante um explosivo deflagrante. (Ramalho, 2004)

1.1.3 Análise de explosivos inorgânicos

A análise de explosivos inorgânicos tem sofrido uma grande evolução nos últimos tempos. O objectivo da química forense é, analisando os resíduos deixados no local da explosão, identificar os constituintes iónicos e revelar a natureza do explosivo usado. (Hargadon, 1992)

Como exemplos de explosivos inorgânicos temos as pólvoras, os compostos explosivos à base de nitrato de amónio, as misturas pirotécnicas, as emulsões e uma enorme variedade de explosivos improvisados. Como já foi referido, o uso destes últimos tem sido cada vez mais frequente. Os principais constituintes destes explosivos são os combustíveis, como é o caso do petróleo, açúcar, enxofre, carvão e alguns metais, e os oxidantes, que são normalmente sais de nitrato, clorato e perclorato. Podem ainda ser adicionados elementos leves como o berílio, o lítio, alumínio e o boro, que aumentam o calor de combustão. Estes explosivos podem ser preparados a partir de explosivos comerciais, militares, ou ainda recorrendo à mistura de várias substâncias que uma vez combinadas resultam num material

explosivo. Devido à sua natureza improvisada existe então uma variedade enorme de explosivos inorgânicos com uma constituição semelhante, variando apenas a composição relativa dos compostos iónicos. Por essa razão não existe uma lista específica de IEDs, no entanto, alguns exemplos comuns são o ANFO (misturas de combustível e nitrato de amónio) e explosivos improvisados à base de açúcares. Pelas proporções em que são adicionados os diversos constituintes é possível associar o engenho usado a determinadas marcas ou organizações, pois estas, à sua maneira, acabam por seguir determinadas “receitas”. (Johns, 2008; Hutchinson, 2008; Miller, 2001)

Deste modo, para a identificação de um explosivo inorgânico torna-se necessário proceder não só à identificação das espécies iónicas presentes no resíduo (análise qualitativa) como também à sua quantificação. Através da análise quantitativa conseguimos conhecer a proporção das espécies químicas em solução aquosa e determinar o seu balanço iónico, permitindo assim identificar o tipo de explosivo usado e ainda possíveis contaminações discriminadoras da sua origem. No entanto, esta última só é possível em cenários de pré-explosão. Quando, por outro lado, estamos perante um cenário de pós-explosão, a interpretação dos resultados é mais complicada. Nestes casos, os vestígios de explosão contém não só uma porção de explosivo que não reagiu, variando as concentrações relativas do composto inicial para o resíduo, como também uma variedade de compostos produzidos pela explosão e possíveis contaminações ambientais, como os nitratos, sulfatos e sódio presentes no solo, que complicam ainda mais a identificação do produto. (Hutchinson, 2008; Yinon, 1993)

Muitas têm sido as técnicas analíticas usadas para este tipo de análise como é o caso da fluorescência de raios-X (XRF) e SEM/EDS que sendo técnicas de análise elementar nos dão informação sobre a natureza do resíduo mas não nos permitem distinguir substâncias onde a única diferença é a concentração de espécies inorgânicas. A XRD também é frequentemente usada pois tem a vantagem de nos permitir ver como os compostos estão combinados e de nos dar informação sobre a rede cristalina do composto. Para além destas, técnicas como a MS e o FTIR também podem ser aplicados neste tipo de análise. Relativamente a CE e a IC, estas apresentam características muito úteis para a análise de explosivos inorgânicos pois permitem uma caracterização da fracção iónica numa vasta gama de concentrações, e dão-lhes a habilidade de determinar os componentes iónicos da

amostra e consequentemente revelar a identidade do explosivo em causa. (Dicinoski, 2006; Hutchinson, 2008)

1.2 Método de análise

1.2.1 Cromatografia

A cromatografia é uma poderosa técnica de separação inventada por Mikhail Tswett no início do século XX, que veio permitir a separação de compostos em misturas complexas que até então eram muito difíceis de separar. O fundamento da técnica está na existência de duas fases, uma móvel e uma estacionária. A amostra a analisar é injectada e transportada pela fase móvel, também chamada de eluente, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. Os compostos injectados são então arrastados pelo eluente e ao passarem por uma fase estacionária que está fixa numa coluna ou numa superfície sólida, serão retidos nesta de acordo com a sua afinidade à mesma. Assim, os componentes com uma maior afinidade à fase estacionária são fortemente retidos nesta, pelo que têm uma mobilidade menor na fase móvel eluindo mais tarde. Por outro lado, os componentes da mistura que apresentam pouca afinidade à fase estacionária, terão maior mobilidade na fase móvel e vão eluir rapidamente. É essa diferença de mobilidade que permite a separação dos componentes de uma mistura. À medida que os compostos são separados na coluna, vão sendo detectados dando origem a um pico cromatográfico, que dependendo das condições e características podem ser analisados qualitativa e quantitativamente. (Skoog, 1992; Weiss, 2004)

1.2.2 Teoria da cromatografia

À medida que as espécies são separadas e detectadas, vão originando uma série de sinais que são registados como picos cromatográficos sob a forma de um cromatograma. A posição dos picos no eixo do tempo permite identificar os componentes enquanto a área dos mesmos possibilita uma medida quantitativa do teor de analito em solução. Existem alguns parâmetros teóricos que nos ajudam a perceber como é feita a identificação das espécies e em que condições é possível proceder à sua quantificação. (Skoog, 1992)

Tempo de retenção

O tempo de retenção (t_R) de um composto é o tempo que decorre desde a sua injeção até ser detectado. É característico de cada composto podendo haver pequenas oscilações com a variação da concentração ou quando se alteram as condições de análise (coluna, fase móvel, temperatura, etc). Dois componentes só serão separados se apresentarem t_R diferentes. Este pode ser calculado segundo a equação 1.

$$t_R = t'_R + t_0 \quad (1)$$

Onde t'_R é o tempo de retenção ajustado ou tempo na fase estacionária e t_0 é o tempo que a espécie demora a atravessar a coluna sem ter interação com a fase estacionária, conhecido como tempo morto ou tempo na fase móvel.

Na figura 1 estão representados graficamente os parâmetros referidos assim como a largura do pico na linha de base, w_b , e a largura deste a meia altura, $w_{0.5}$. (Weiss, 2004; Schäfer, 1996)

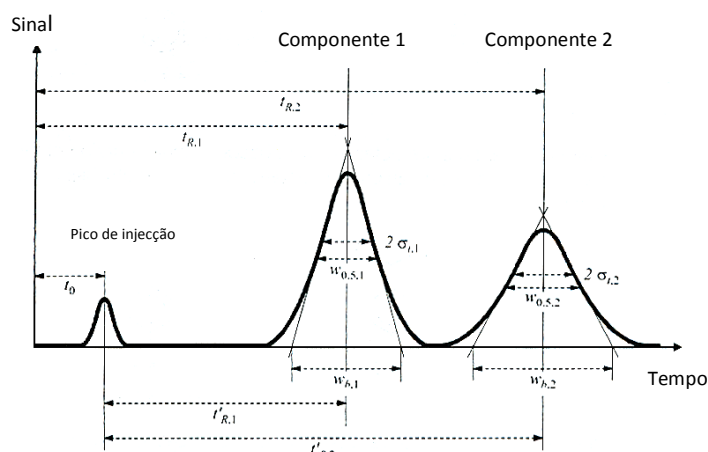


Fig.1 – Exemplo de um cromatograma típico e representação gráfica dos parâmetros t_M e t_R . (Adaptado de Schäfer, 1996)

Factor de capacidade

O factor de capacidade (k') é independente do equipamento pelo que é mais conveniente para a caracterização de uma substância. É uma medida da habilidade da coluna em reter o composto e relaciona o tempo em que o analito permanece na fase estacionária com o tempo morto. Valores de k' muito pequenos significam uma separação pobre. Quando por sua vez são muito elevados, temos tempos de corrida muito longos e consequentemente perda de sensibilidade por alargamento do pico. O k' pode ser determinado através da equação 2.

$$k' = \frac{t_R'}{t_0} \quad (2)$$

Dois componentes de uma mistura só são separados se apresentarem valores de k' diferentes. (Weiss, 2004; Skoog, 1992; Schäfer, 1996)

Selectividade

A selectividade é um parâmetro decisivo na análise da separação de dois compostos. Quanto maior o valor de selectividade, melhor será a separação de dois picos consecutivos. Esta pode ser estimada pela equação 3.

$$\alpha = \frac{k'2}{k'1} = \frac{t_{R,2}'}{t_{R,1}'} \quad (3)$$

Resolução

A resolução (R_s), determinada pela equação 4, é um parâmetro importante a ter em conta na análise cromatográfica pois representa uma medida da qualidade da separação de dois picos consecutivos.

$$R_s = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{b,1} + w_{b,2}} = \frac{1,177(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{0,5,1} + w_{0,5,2}} \quad (4)$$

Quando se obtém valores de $R_s = 0,5$, os picos podem ser considerados separados mas não resolvidos. Para a análise quantitativa são recomendadas resoluções acima de 1,5. (Weiss 2004; Schäfer, 1996)

Eficiência da coluna

A eficiência de uma coluna cromatográfica é dada pelo número de pratos teóricos (N), obtidos pela equação 5.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (5)$$

Quanto maior o número de pratos teóricos, menor é a altura dos mesmos e consequentemente teremos uma menor largura de bandas e uma melhor separação dos picos cromatográficos. (Schäfer, 1996)

1.2.3 Cromatografia iónica

A cromatografia de troca iónica, também designada por cromatografia iónica, refere-se a um método moderno e eficiente na separação e determinação de iões baseado em resinas de permuta iónica. Foi desenvolvida em meados da década de 70 quando se demonstrou que era possível separarem-se misturas de catiões e aniões por HPLC usando colunas compostas por resinas de troca iónica. Neste método, a separação dos compostos baseia-se nos processos de troca iónica que ocorrem entre a fase móvel e os grupos de troca iónica ligados ao suporte material. (Skoog, 1992)

As fases estacionárias mais usadas nesta técnica são compostas por resinas sintéticas de permuta iónica de polistireno produzidas por co polimerização de estireno e divinilbenzeno, como mostra a figura 2.

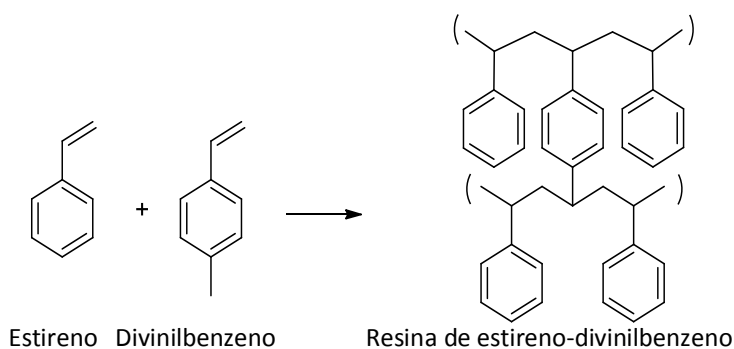


Fig 2 – Representação da preparação de uma resina de estireno-divinilbenzeno. (Adaptado de Schäfer, 1996)

Para que o polímero se torne activo aos iões é necessário ligá-lo a grupos funcionais ácidos ou básicos dependendo do tipo de ião em causa. A resina de troca catiónica é obtida por uma sulfonação do polímero, enquanto que a usada para o equilíbrio de troca aniónica é preparada através de uma clorometilação seguida de uma aminação do polímero. A figura 3 apresenta os compostos que constituem as colunas de troca iónica. (Schäfer, 1996)

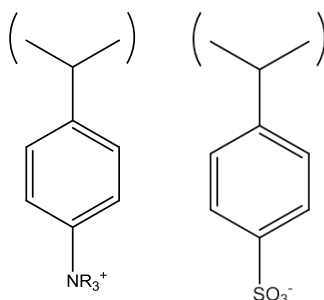


Fig.3 – Representação do empacotamento das resinas de permuta iónica. (Adaptado de Schäfer, 1996).

Relativamente à fase móvel, esta deve dissolver a amostra e deve interagir com o soluto de modo a haver selectividade entre os picos. É constituída por soluções aquosas que podem conter quantidades moderadas de metanol ou outro solvente orgânico miscível em água. Pode ainda ser adicionado acetonitrilo para melhorar a resolução dos picos e preservar o eluente. (Skoog, 1992; Schäfer, 1996)

Sistema da cromatografia iónica

O cromatógrafo iónico é composto por uma bomba de pistão que envia o eluente ao longo da coluna. A amostra é injectada no sistema através de um *loop* que doseia a quantidade a ser analisada. Esta vai ser arrastada pelo eluente (fase móvel) ao longo do sistema até chegar à coluna (fase estacionária) onde se dá a separação. O empacotamento desta é composto por resinas (R) ligadas covalentemente a grupos funcionais carregados com uma carga fixa (A), aos quais estão ligados iões com carga oposta, designados por contra iões (M). Quando a amostra percorre a coluna, iões com a mesma carga que os grupos funcionais são eluídos, enquanto os contra-íões podem ser substituídos pelos iões do soluto com a mesma carga (X no caso dos catiões e Y no caso dos aniões), ficando os últimos temporariamente retidos. Os vários iões da amostra permanecem por um período de tempo diferente na coluna devido à afinidade à fase estacionária e assim é feita a separação. Os componentes básicos de um cromatógrafo iónico assim como os equilíbrios de troca iónica estão representados esquematicamente na figura 4. (Weiss, 2004; Yinon, 1993; Schäfer, 1996)

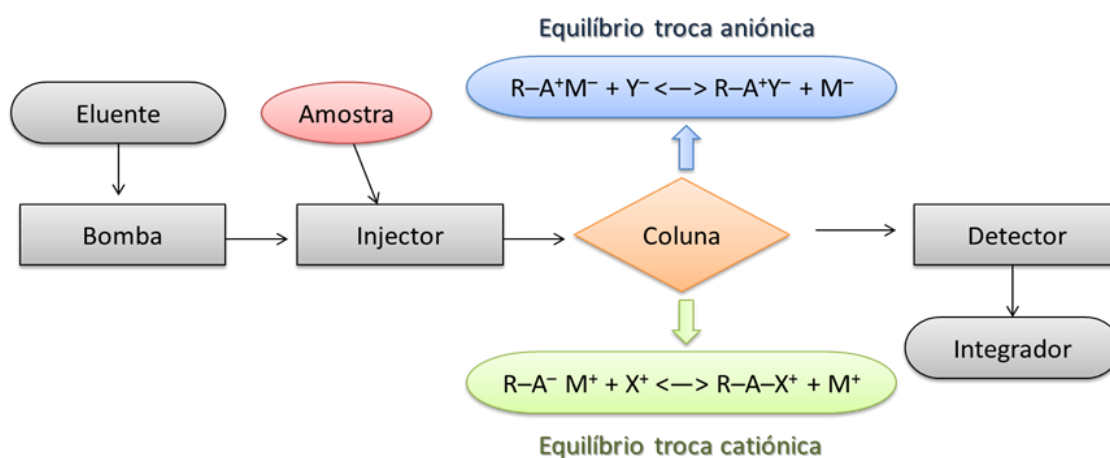


Fig.4 – Representação esquemática dos componentes básicos de um cromatógrafo iónico sem supressor.

Detectores

Os métodos de detecção aplicados em cromatografia iónica são divididos em electroquímicos, onde temos detectores conductométricos e amperométricos, e espectrométricos como o caso do UV-Vis, fluorescência e detecção por índice de refração. A detecção mais vulgar neste tipo de cromatografia é a electroquímica usando um detector universal de condutividade. (Weiss, 2004; Skoog, 1992)

No entanto, devido à elevada capacidade de algumas colunas de troca iónica, para eluir grande parte dos iões em solução são necessárias elevadas concentrações de eluente. Nestes casos, a condutividade da fase móvel pode então mascarar a dos iões eluídos diminuindo assim sensibilidade do detector. Esta limitação pode ser ultrapassada introduzindo uma coluna supressora com uma segunda resina de troca iónica que converte os iões do solvente em espécies moleculares de ionização limitada sem afectar os iões do analito. Neste caso a detecção é fácil pois a condutividade do eluente é reduzida para aproximadamente zero. (Weiss, 2004; Skoog, 1992)

Contudo, pode-se optar por um sistema sem recorrer ao uso do supressor. Aqui a detecção é feita pela diferença de condutividade que é verificada quando o analito sai da coluna. As diferenças de condutividade entre o eluente e o analito podem ser ampliadas usando fases estacionárias de baixa capacidade, que tornam possível a eluição de espécies que tenham baixa condutividade ou optando por eluentes que tenham baixa condutividade. (Cazes, 2004; Skoog, 1992; Harris, 1996)

1.3 Validação de Métodos Analíticos

Em qualquer análise química há necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos. Dados não confiáveis podem levar a decisões erradas e trazer consequências indesejáveis. Para que tal não aconteça, é necessário garantir que o método está a responder de maneira adequada e desejada. Isso é conseguido através da validação do procedimento de medição antes de este ser aplicado em rotina que segundo a norma ISO/IEC 17025 é “uma confirmação por teste e apresentação de evidências objectivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”. (VIM, 2008; Ribani, 2004) Na prática resume-se à avaliação de diversos parâmetros analíticos que devem cumprir com critérios definidos em função do objectivo do ensaio, ou seja, a validação deve

provar que o procedimento de medição é adequado ao uso em vista. A escolha dos parâmetros avaliados assim como dos seus valores alvo, deve ser feita tendo em consideração tanto a legislação existente como os requisitos do cliente, de modo a definir uma estratégia que os cumpra rigorosamente. Para além disso, há que ter em conta não só o objectivo final, mas também os custos e gastos inerentes à aplicação do método. Os dados adquiridos durante este processo, para além de possibilitarem um estudo do desempenho do método, vão permitir o desenvolvimento de critérios de controlo da qualidade do ensaio que serão posteriormente aplicados em rotina.

1.3.1 Validação do desempenho qualitativo

Quando se está a trabalhar em rotina é muito comum, num primeiro passo da análise, optar pelo uso de um método qualitativo de *screening* que nos indica a presença ou ausência de determinados analitos acima de um valor alvo (habitualmente o limite de detecção). Se for verificada a presença de espécies e se for necessário determinar a sua concentração, então procede-se a uma segunda etapa onde é feita uma análise quantitativa. A qualidade dos resultados provenientes de métodos qualitativos é portanto de grande importância, pelo que tal como acontece com os métodos quantitativos, também estes devem ser validados, embora ainda existam poucos guias que indiquem como esta validação deve ser feita. (Trullols, 2004)

1.3.2 Validação do desempenho quantitativo

Os métodos instrumentais quantitativos permitem a determinação da quantidade de um ou mais analitos numa amostra, muitas vezes, através de uma interpolação do sinal instrumental da amostra numa curva de calibração. Quando se desenvolve um método deste tipo é necessário verificar se este responde de modo a reproduzir os resultados pretendidos. Para tal, são escolhidos diversos parâmetros analíticos que devem ser avaliados. Neste trabalho irá ser estudada a linearidade e gama de trabalho, a precisão, o erro de medição e os limites de detecção e quantificação do método. (Ribani, 2004; Trullols, 2004)

1.3.2.1 Linearidade e gama de trabalho

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer respostas directamente proporcionais à concentração numa determinada gama de trabalho. A resposta instrumental

é caracterizada por uma calibração interna ou externa, e o estudo da relação entre o sinal e a concentração é expresso por uma equação de uma recta do tipo $y = a + bx$. A linearidade pode ser observada visualmente pelo gráfico obtido com a calibração. O cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson (r), dá-nos algumas indicações sobre a qualidade de ajuste da recta. Quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos em torno da relação linear. A utilização do r para avaliar a resposta instrumental deve ser feita acompanhada pela construção de um gráfico de residuais. Para isso é necessário calcular o residual, ou seja, a diferença entre o valor obtido experimentalmente e o valor obtido por interpolação do sinal instrumental na curva de calibração. (Ribani, 2004; INMETRO, 2003)

A linearidade da resposta instrumental é avaliada de forma mais rigorosa através de testes estatísticos de qualidade de ajuste como é o caso do ANOVA e do χ^2 , aplicados em função do tipo de modelo de regressão usado para descrever a relação entre o sinal instrumental e a concentração do analito. A escolha do modelo indicado é determinante na análise quantitativa pois é essencial assumir, de forma adequada, uma correcta relação entre o sinal instrumental e a concentração do analito. Quando tal não acontece, o desempenho da quantificação instrumental pode ser condicionado e o nosso resultado vir afectado por erros significativos. Mas antes de escolher qual o modelo que melhor se adequa existem alguns parâmetros que têm de ser estudados como é o caso da normalidade dos dados, a presença de valores aberrantes e a homogeneidade de variâncias. (Silva, 2004)

1) Normalidade

Quando um número infinito de medições x_i realizado no mesmo sistema, designado por população, é definido por uma distribuição normal, existe uma relação bem conhecida que permite estimar um intervalo definido pela sua média μ e desvio padrão σ , que inclui os resultados de medição com uma determinada probabilidade. A frequência relativa com que uma determinada medição ocorre pode ser representada por uma curva Gauss onde temos intervalos construídos com base na μ e σ da população.

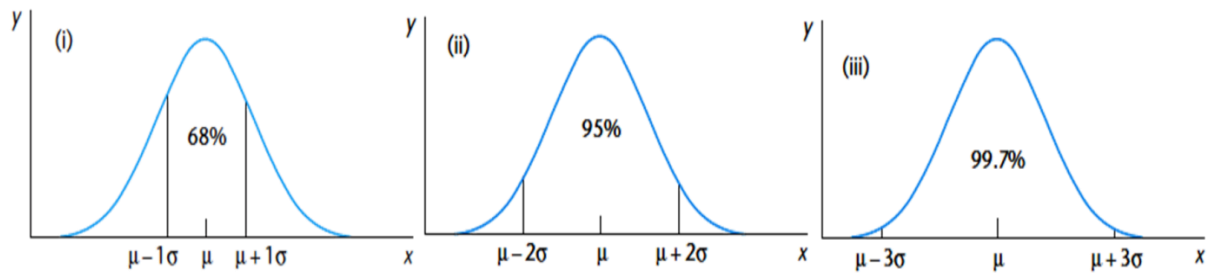


Fig.5 – Representação da Curva de Gauss. (Adaptado de Miller, 2005)

Analisando a curva verifica-se que para um conjunto de medições, aproximadamente 68% estão contidas no intervalo $\mu \pm \sigma$, aproximadamente 95% vão estar dentro do intervalo $\mu \pm 2\sigma$ e por fim, aproximadamente 99,7% pertencem ao intervalo definido por $\mu \pm 3\sigma$. (Silva, 2004; Miller, 2005)

2) Valores aberrantes

O estudo de valores aberrantes pode ser feito recorrendo a vários testes estatísticos como é o caso dos testes de Grubbs. Existem testes de Grubbs para a identificação de valores aberrantes únicos, emparelhados e antagónicos. Para o primeiro caso, onde se pretende a identificação de valores aberrantes isolados, correspondente à observação mais baixa ou alta, aplica-se a seguinte equação:

$$G_{calc} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (6)$$

Onde x_i corresponde ao valor da amostra que vai ser testado e \bar{x} e s são respectivamente a média e o desvio padrão de todos os resultados. Posteriormente o valor calculado é comparado com um valor crítico para o número total de observações e a um nível de confiança desejado. Se o $G_{calc} > G_{crítico}$, então o valor é considerado um valor aberrante.

Não havendo valores aberrantes únicos, é necessário ter em conta a possibilidade de existirem valores aberrantes emparelhados ou antagónicos, ou seja, um par de valores que se distingue dos restantes valores. Assim, deve-se avaliar a presença de valores aberrantes nos extremos do conjunto, testando os dois máximos, os dois mínimos e os dois antagónicos (máximo e mínimo do conjunto). Para tal calcula-se a redução percentual do desvio padrão (\mathfrak{R}) através da equação 7.

$$\mathfrak{R}(\%) = 100 \left(1 - \frac{s_2}{s} \right) \quad (7)$$

Onde s corresponde ao desvio padrão do conjunto dos dados e s_2 ao desvio padrão de todas as observações menos as duas mais altas, mais baixas ou opostas. O \mathfrak{R} calculado é então comparado com o respectivo valor crítico, específico deste teste, da mesma forma que no caso anterior. (Silva, 2004)

3) *Homogeneidade de variâncias*

Para avaliar a homogeneidade da dispersão dos resultados ao longo da gama de calibração, testa-se se a variância à concentração mais elevada é significativamente maior da variância à concentração mais baixa através de um teste F unilateral:

$$F_{calc} = \frac{s_2}{s_1} \quad (8)$$

Onde s_2 e s_1 são os desvios padrão obtidos nas leituras aos níveis de concentração mais alto e mais baixo, respectivamente. Se $F_{calc} < F_{critico}$, as variâncias às concentrações dos extremos são estatisticamente idênticas, logo os dados são homogêneos em termos da dispersão da resposta instrumental. Se por sua vez se verificar o oposto, a resposta instrumental será heterogênea no que respeita à precisão do sinal instrumental.

4) *Modelos matemáticos que descrevem a resposta instrumental*

Depois de verificada a normalidade dos dados e a ausência de outliers, é a homogeneidade de variâncias que nos permite escolher o tipo de modelo de regressão que melhor se adequa a cada caso. Estes podem ser modelos ponderados ou não ponderados dependendo da variação da dispersão instrumental ao longo da gama de calibração. Os modelos lineares ponderados e não ponderados são destes os mais usados, e serão os aplicados neste trabalho.

Modelos lineares não ponderados

Quando o estudo inicial nos indica que existe homogeneidade de variâncias e a resposta é linear, o modelo que melhor descreve a resposta instrumental é o modelo linear não ponderado e a relação entre a variável independente x e dependente y é traduzida por:

$$y = a + bx \quad (9)$$

Onde a e b são respectivamente a ordenada na origem e o declive da recta.

Este modelo parte do princípio que a incerteza associada ao eixo dos x não afectam a regressão estatística e procura a recta que minimiza as distâncias entre ela e os pontos experimentais considerando variações no sinal instrumental. A equação que descreve a recta obtida é usada para estimar as concentrações das amostras desconhecidas recorrendo à interpolação dos seus sinais instrumentais.

Os erros aleatórios associados à dispersão do sinal instrumental são calculados pelo desvio padrão residual que mede a distância entre os sinais instrumentais obtidos e a recta de regressão (equação 10).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (10)$$

Como se pode ver pela equação, esta usa o valor do residual $(y_i - \hat{y}_i)$, estimado pela diferença entre os valores obtidos experimentalmente, y_i , e os valores \hat{y}_i calculados para x_i pela recta de regressão obtida.

Depois de encontrada a linha de regressão e consequentemente o valor do declive e da ordenada na origem, é muito simples calcular, por interpolação, a concentração, x , correspondente a qualquer sinal instrumental, y . No entanto, a esta interpolação está sempre associada uma incerteza. Esta vai ser dada pelo desvio padrão S_{x_0} , calculado por:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

Onde y_0 é o sinal experimental interpolado que estima x_0 e foi determinado por m número de leituras.

Quando é usado o modelo linear não ponderado para descrever a relação entre o sinal instrumental e a concentração, a avaliação da linearidade e a qualidade do ajuste do modelo aos sinais são feitos pela aplicação do teste ANOVA. (Silva, 2004)

Modelos lineares ponderados

Quando, por outro lado, se verifica uma relação linear entre o sinal instrumental e a quantidade de analito mas a dispersão da resposta instrumental é heteroscedástica, a curva de calibração deve ser descrita por modelos ponderados. Aqui verifica-se um aumento do desvio padrão do sinal instrumental com a concentração do analito pelo que se torna necessário ponderar essa variação na selecção da recta de regressão que minimiza os residuais ponderados. A linha de regressão deve ser calculada de maneira a dar um peso adicional aos pontos onde a dispersão é menor, pois é mais importante esta passar perto a esses pontos do que a outros com concentração e consequentemente dispersão maiores. Isto é feito aplicando a cada ponto um factor de ponderação, w_i , dado pelo inverso da variância, s_i^{-2} :

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i (s_i^{-2}/p)} \quad (12)$$

Onde s_i é o desvio padrão da resposta instrumental de n pares ordenados (x_i, y_i) em que i varia de 1 a n a p níveis de concentração.

O declive b_w , e a ordenada na origem a_w , da linha de regressão ponderada são dados por:

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (13) \quad a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad (14)$$

Em que \bar{x}_w e \bar{y}_w formam o par ordenado (\bar{x}_w, \bar{y}_w) designado por centroide ponderado que constitui um dos pontos da linha de regressão ponderada. Podem ser calculados por:

$$\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{n} \quad (15) \quad \bar{y}_w = \frac{\sum w_i y_i}{n} \quad (16)$$

Em que n é o número de pontos experimentais da recta de calibração.

Tal como acontece nos modelos lineares não ponderados, nos ponderados o teor estimado por interpolação também é afectado por uma incerteza, dada pelo desvio padrão ponderado calculado equação 17.

$$S_{x_{ow}} = \frac{S_{(y/x)w}}{b} \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right\}^{1/2} \quad (17)$$

Onde w_0 representa o peso relativo atribuído à leitura y_0 , e $S_{(y/x)w}$ é o desvio padrão residual ponderado calculado pela seguinte equação:

$$S_{(y/x)w} = \left[\frac{(\sum_i w_i y_i^2 - n \bar{y}_w^2) - b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)}{n-2} \right] \quad (18)$$

Nos casos onde são usados os modelos lineares não ponderados, é utilizado o teste χ^2 para avaliar a linearidade e a qualidade de ajuste do modelo usado aos sinais. (Silva, 2004)

1.3.2.2 Precisão

A precisão refere-se à dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos numa mesma amostra ou em amostras semelhantes. É avaliada pelo desvio padrão absoluto ou relativo obtido em condições de repetibilidade, precisão intermédia ou reprodutibilidade. Neste trabalho em particular, a avaliação da precisão foi feita em condições de repetibilidade.

Repetibilidade: De acordo com o VIM, a repetibilidade é definida como a precisão de medição para conjunto de condições, que inclui o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições operativas e mesma localização, e medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares, num curto intervalo de tempo. Este parâmetro permite avaliar as variações no desempenho do método nas mesmas condições e a concordância de duplicados obtidos nestas condições é avaliada pelo cálculo do limite de repetibilidade. Este parâmetro é importante quando são realizadas réplicas em condições de repetibilidade em rotina, pois permite saber se a precisão do método é semelhante àquela que se obteve durante a validação. (VIM, 2008)

1.3.2.3 Exactidão

É definida como a concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro da mensuranda. Os métodos analíticos nem sempre conseguem quantificar exactamente o teor da amostra, pelo que se torna necessário avaliar a exactidão dos mesmos. Os processos mais usados para esse fim são a análise de materiais de referência certificados (MRC) ou de amostras fortificadas. No nosso caso foi utilizado um MRC, e a avaliação da significância dos erros sistemáticos foi feita por comparação dos teores obtidos pela sua análise com os teores esperados. (VIM, 2008; Ribani, 2004; EURACHEM, 1998)

1.3.2.4 Limiares analíticos

Limite de detecção: Pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser detectada com certeza estatística razoável usando um determinado procedimento analítico. (EURACHEM, 1998)

Limite de quantificação: Pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificada com uma precisão e exactidão aceitável usando um determinado procedimento analítico. (EURACHEM, 1998)

Os limiares analíticos podem ser calculados com base no modelo de regressão, usando os dados recolhidos durante a calibração instrumental. Aplicando a seguinte equação é possível calcular os limiares analíticos do método:

$$L = \frac{K S_{y/x}}{b} \quad (19)$$

Onde $S_{y/x}$ é do desvio padrão residual , b o declive da curva de calibração e K é substituído por 3 quando se pretende o cálculo do limite de detecção (LD) e por 10 quando se quer determinar o limite de quantificação (LQ).

No entanto, esta aproximação apresenta a desvantagem de estimar por excesso os limiares quando não existe homogeneidade de variâncias da resposta instrumental ou quando a nossa gama de trabalho é muito alta e está muito afastada dos limites de detecção/quantificação do aparelho. A estratégia usada para contornar esta limitação será abordada no capítulo 3.

1.3.3 Incerteza da medição

Uma medição em química tem sempre associada a si determinados factores que afectam o resultado potencialmente afastando-o do valor verdadeiro. Deste modo, no final da validação do método, é necessário identificar todas as fontes de erros sistemáticos e aleatórios que durante o processo de medição condicionam o nosso resultado final de modo a conseguir calcular a incerteza global do processo. Esta é definida como um “parâmetro não-negativo que caracteriza dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas”. (VIM, 2008) O cálculo da incerteza associada a um resultado, assegura a qualidade do mesmo e permite-nos a determinação de um intervalo onde asseguramos, com um certo grau de confiança (normalmente 95 ou 99%), que inclui o valor convencionado como verdadeiro da quantidade medida. Existem diversas abordagens para o cálculo de incertezas, no entanto, em todas cumprem-se as seguintes etapas:

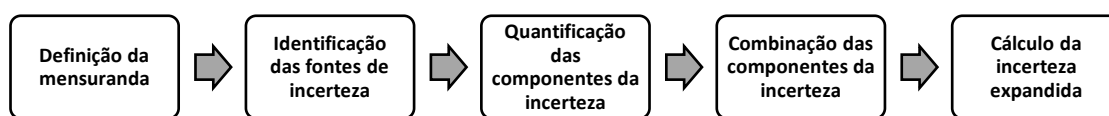


Fig.6 – Esquema com as etapas a seguir para o cálculo da incerteza associada a uma medição. (Adaptado de Silva, 2004.)

Inicialmente é definida a mensuranda, ou seja, a quantidade sujeita a medição. De seguida procede-se à identificação de todas as fontes de incerteza que afectam o nosso resultado que, pode ser um dos passos mais complicados quando se trata de um processo de medição mais complexo. Estas fontes podem ser quantificadas em avaliações do tipo A (baseada em tratamentos estatísticos) ou tipo B (avaliação da incerteza por outro processo que não a do tipo A). Todas as pesagens, medições de volume, diluições efectuadas assim como a preparação de padrões e o processo de interpolação dos sinais na recta são afectadas por fontes de incerteza. (VIM, 2008) Depois de identificadas e quantificadas todas as fontes de incerteza, na forma da incerteza padrão (u_x), às quais se associa um nível de 68% de confiança, estas são combinadas pela lei da propagação de incertezas ou métodos numéricos equivalentes. A incerteza que vai ser reportada com o resultado deve vir na forma de incerteza expandida (U_x), associada um nível de confiança de 95 ou 99%. Para tal, é necessário converter a incerteza padrão combinada em expandida, multiplicando a primeira

por um factor de expansão (k) dado pela distribuição *t-student* com $n-1$ graus de liberdade para determinado nível de confiança (t ($n-1$; 95%)). (EURACHEM, 2000)

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

Na análise de catiões as soluções mãe, das quais foram feitas todas as diluições tanto para a preparação das soluções mãe diluídas como dos padrões usados durante o processo de validação, foram preparadas a partir dos seguintes sais: Nitrato de Lítio (Aldrich a 99,99%); Nitrato de Sódio (Riedel-de Haen a 99,5%); Cloreto de Amônio (Merck a 99-100,5%); Nitrato de Potássio (Merck a 99,995%); Nitrato de Cálcio hidratado (Aldrich a 99%); Nitrato de Magnésio hexahidratado (Aldrich a 99,995%); Nitrato de Estrôncio (Merck a 99,99%) e Nitrato de Bário (Aldrich a 99,999%). Para a preparação de todas as soluções e padrões usados, assim como para a lavagens do material, foi usada uma solução de HNO_3 0,001 M, feita a partir de ácido nítrico Merck a 65%.

Relativamente aos aniões, as soluções mãe usadas para a preparação das soluções mãe diluídas e dos padrões, são da Merck e têm as seguintes concentrações: Fluoreto: (1002 ± 2) mg/L, Cloreto: (999 ± 2) mg/L; Nitrito: (1003 ± 5) mg/L, Brometo: (1000 ± 2) mg/L, Nitrato: (1001 ± 5) mg/L, Sulfato: (1004 ± 2) mg/L. No caso do clorato e carbonato utilizou-se os seguintes sais: Carbonato de sódio (Sigma a 99%) e Clorato de sódio (Riedel-de Haen a 99%).

Foram ainda usados ácido dipicnólico (Sigma-Aldrich a 99%), tartárico (Merck a 99,5-101%) e ftálico (Panreac Sintesis a 99,5%) para a preparação das fases móveis. Os solventes usados para essa mesma preparação foram água Milli Q com condutividade a ≥ 18 m Ω /cm, acetonitrilo (Merck para HPLC) e acetona (Carlo Erba para HPLC). O acerto do pH foi feito recorrendo a uma solução de NaOH 2 mol/L preparada a partir do sal de hidróxido de sódio p.a. (Merck a 99%)

2.2 Material e Equipamento

- O cromatógrafo iónico usado neste trabalho foi um equipamento da marca Metrohm constituído por Detector Modelo 732 IC, uma Separation Center Modelo 733 IC, uma Bomba Modelo 709 IC e com sistema de injeção automática Modelo 813 IC.



Fig.7 – Cromatógrafo iónico usado neste trabalho.

- Para as medições de volumes foram usadas micropipetas automáticas de volume variável da marca VWR.
- A água usada para preparação de soluções, eluente e para as lavagens foi purificada num sistema de purificação de água modelo Direct-Q5 da marca Millipore Corporation.
- Todas as pesagens foram realizadas numa balança da marca Mettler modelo Toledo PB303.
- O eluente foi desgaseificado num banho Ultrasónico Grant modelo XB14.
- O medidor pH usado foi um 744 pH Meter da Metrohm
- A placa aquecimento e agitação usada é da marca Heidolph modelo MR 3001.
- Material comum de laboratório.

2.3 Procedimento Experimental

2.3.1 Análise catiões

Os métodos para a análise de catiões foram desenvolvidos com o objectivo de identificar e quantificar: lítio, sódio, amónio, potássio, cálcio, magnésio, estrôncio e bário. Tal como acontece com a maior parte das análises químicas, inicialmente é feita uma análise qualitativa, onde se verifica a presença ou ausência de determinados analitos. Só quando estes são detectados é que se prossegue para uma segunda etapa onde é feita uma análise quantitativa. Nesta última, houve a necessidade de serem criados dois métodos de análise,

uma vez que o tempo de corrida necessário para a quantificação de todos os catiões referidos, implica um significativo alargamento dos picos cromatográficos do bário afectando significativamente a sua quantificação. Deste modo, criou-se um método para a quantificação individual do bário, aumentando o fluxo da fase móvel de modo a serem obtidos picos mais estreitos e consequentemente melhores resultados, e um para as restantes espécies em análise. Foi ainda criado um segundo método de análise onde são quantificados todos os restantes catiões.

Como já foi referido anteriormente, tanto a validação qualitativa como a quantitativa são importantes para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Deste modo, tanto o método de identificação como os usados para a quantificação têm de ser validados antes de serem aplicados em rotina.

2.3.1.1 Condições experimentais

A análise de catiões é feita usando uma coluna Metrosep modelo cation 1-2 com empacotamento de sílica gel com grupos de ácido maleico polibutadieno e dimensões de 125 x 4,0 mm. A injeção é automática e feita através de um *loop* com capacidade de 10 µL. O intervalo de pH recomendado para as soluções a analisar situa-se entre 2,5-3,5, pelo que estas devem ser preparadas usando uma solução de ácido nítrico de modo a ajustar o pH a esse intervalo. (Schäfer, 1996) A aquisição dos dados obtidos durante a análise é feita através do software IC Metrodata.

O protocolo analítico começa com uma avaliação qualitativa, onde usando um método com fluxo de 0,8 mL/min e tempo total de corrida de 27 min se faz uma identificação de todos os analitos catiónicos em estudo presentes em solução. Segue-se uma análise quantitativa que, como já foi referido, é feita aplicando dois métodos: para quantificar o bário usa-se um método com fluxo de 2,5 mL/min e tempo total de corrida de 10 min; para os restantes catiões o método escolhido tem um fluxo de 1 mL/min e a duração de 15 min. O fluxo usado nos últimos métodos referidos, foi otimizado tendo como critério a melhor resolução obtida entre os picos. O eluente usado nos três métodos é preparado dissolvendo 1,5 g de ácido tartárico e 0,418 g de ácido dipiconílico numa solução de 2,5 L de água Milli Q com 1% de acetonitrilo. A mistura é filtrada, arejada com fluxo moderado de

azoto durante cerca de 10 min e desgaseificada em banho frio de ultra-sons durante aproximadamente 20 min antes de ser colocada no aparelho.

A tabela 1 apresenta um resumo das condições experimentais descritas anteriormente.

Tabela 1 – Condições experimentais usadas na análise qualitativa e quantitativa dos catiões.

Análise	Curva Combinada		Curva individual Bário	
	Qualitativa	Quantitativa	Qualitativa	Quantitativa
Coluna	IC Cation Column Metrosep Cation 1-2			
Fluxo (mL/min)	0,8	1,0	0,8	2,5
Tempo corrida (min)	27	15	27	10
Eluente	4 mmol/L ácido tartárico, 1 mmol/L ácido dipicolínico, 1% acetonitrilo			

2.3.1.2 Padrões usados na validação dos métodos para a análise dos catiões

Para a validação do desempenho da análise qualitativa foram preparados dois padrões de controlo (PC) diários, contendo todos os iões referidos, com concentrações correspondentes aos extremos da gama de trabalho escolhida. Para a validação do desempenho das análises quantitativa preparou-se uma curva de calibração individual para o bário e uma combinada para os restantes catiões. De seguida, e durante todo o estudo de validação, foram preparados diariamente dois PC, semelhantes aos usados na validação qualitativa com a diferença que os PC do bário são individuais, que permitem o estudo da estabilidade da curva. Foi ainda preparado um padrão com concentração equivalente ao segundo nível da gama de concentração, dois meses após a preparação do usado para a validação, com o objectivo de estudar a estabilidade dos padrões. Todas as soluções e diluições foram feitas com uma solução de 0,001 M HNO_3 de modo a ajustar o pH das mesmas ao intervalo recomendado para utilização da coluna. Todas as soluções mãe e padrões da curva foram conservados no frigorífico a uma temperatura de cerca de 5°C.

Preparação das soluções mãe

Os padrões de calibração e de controlo usados durante a validação foram obtidos por diluição de soluções mãe preparadas a partir dos respectivos sais ou recorrendo a soluções mãe diluídas das anteriores. As massas pesadas para a preparação das soluções mãe de cada espécie são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Massas pesadas para a preparação das soluções mãe e respectivas concentrações.

Solução Mãe	Li ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
m _{sal} pesada (g)	0,993	0,370	0,297	0,259	0,454	1,054	0,121	0,191
Conc. _{Catão} (mg/L)	999,58	1000,79	1001,52	1001,52	999,33	999,91	500,98	1003,69

Preparação dos padrões da curva de calibração

Para a construção das curvas de calibração foram preparados quatro padrões da calibração. Como já foi referido, foi preparada uma curva combinada que inclui o lítio, sódio, amónio, potássio, cálcio, magnésio e estrôncio, e uma curva individual para o bário. Como se pode ver pelo esquema que se segue (Fig.8), onde está representada a preparação dos padrões que constituem as curvas de calibração, em alguns casos houve a necessidade de preparar uma solução mãe diluída por diluição da solução inicial.

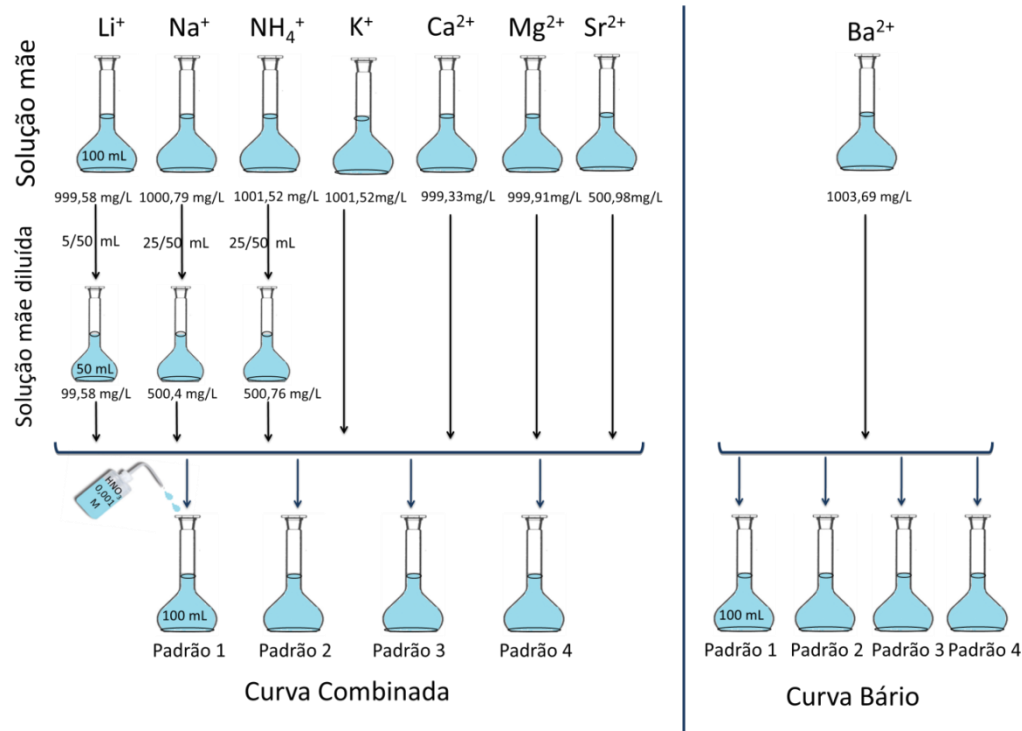


Fig.8 - Esquema de preparação das curvas de calibração combinada e do bário usadas na validação do desempenho quantitativo dos métodos.

As tomas tiradas das respectivas soluções mãe ou das soluções mãe diluídas para a preparação de 100 mL dos padrões combinados ou dos padrões do bário, segundo o esquema apresentado anteriormente, estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 3 – Tomas a tirar das soluções mãe para a preparação de 100 mL dos padrões das curvas de calibração dos cátions.

		Curva Combinada							Curva Bário
Catião		Li ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
Solução (mg/L)		99,58	500,39	500,76	1001,52	999,33	999,91	500,98	1003,69
V Stock	Padrão 1	200	200	200	200	200	200	1	1,5
	Padrão 2	400	350	350	400	400	350	2	2,5
	Padrão 3	600	500	500	600	600	500	3	3,5
	Padrão 4	800	650	650	800	800	650	4	4,5

As tomas entre 200-800 µL foram efectuadas através de uma micropipeta de 100-100 µL, para as de 1 a 4,5 mL foi usada uma pipeta de 5 mL.

Preparação dos padrões de controlo

Para a validação do procedimento de análise qualitativa foram preparados, diariamente, em balões de 10 mL, dois PC correspondentes à concentração mais baixa, PC1, e mais alta, PC2, da gama de trabalho. Para isso foi necessário preparar soluções intermédias preparadas por diluição das soluções mãe iniciais. No caso do estrôncio, foi usada a solução mãe inicial de 500 mg/L. As concentrações das soluções assim como as tomas retiradas das mesmas para a preparação dos PC, estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Tomas tiradas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação de 10 mL dos PC usados na validação do procedimento de análise qualitativa dos cátions.

		PC Combinado							
Catião		Li ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
Sol. usada (mg/L)		10	50	50	100	100	100	500,98	500
> stock	PC1	200	200	200	200	200	200	100	300
	PC2	800	650	650	800	800	650	400	900

No caso dos PC usados para o estudo da estabilidade da curva, o esquema de preparação e as tomas são as mesmas, no entanto, os padrões do bário são preparados separadamente.

2.3.2 Análise aniões

A análise de aniões tem como objectivo identificar e quantificar fluoreto, brometo, cloreto, clorato, nitrito, nitrato, sulfato e carbonato. Esta será feita pelo mesmo esquema que a validação dos catiões, no entanto, para cada um dos métodos será usada uma coluna diferente, servindo também como forma de confirmação de identidade. No caso do carbonato não foi possível fazer a sua quantificação pois este apresenta-se como pico de sistema da coluna. (Schäfer, 1996) Também para os aniões será feita a validação de todos os métodos usados.

2.3.2.1 Condições experimentais

A análise dos aniões é feita no mesmo cromatógrafo usado na análise dos catiões mas usando diferentes colunas. Para a análise qualitativa, onde são identificados todos os aniões referidos, é usada uma coluna Metrosep modelo Anion Dual 2, constituída por uma fase estacionária de polimetacrilato com grupos quaternários de amónio e com a dimensão de 75 x 4,6 mm. O método escolhido tem um fluxo de 0,7 mL/min e duração total de 20 min. O eluente recomendado para esta coluna é feito à base de ácido ftálico. Para prepará-lo dissolvem-se 2,075 g do ácido referido numa mistura de 2,450 L de água e 50 mL de acetonitrilo. Depois de filtrar a mistura, ajusta-se o pH a 4,5 com uma solução de NaOH a 2 mol/L e esta é arejada durante cerca de 10 minutos com fluxo moderado de azoto. Por fim esta é desgaseificada em banho frio de ultra-sons durante cerca de 20 min antes de ser colocada no aparelho. Para a quantificação dos aniões em solução, à excepção do carbonato, é usada uma coluna da marca Hamilton modelo PRP-X100 com um empacotamento de um copolímero de polistireno/divenilbenzeno com grupos quaternários de amónio e dimensões de 125 x 4,0 mm. O método desenvolvido envolve um fluxo de eluente de 1,2 mL/min e tempo total de corrida de 25 min. O eluente é preparado dissolvendo 0,323 g de ácido ftálico numa mistura de 0,9 L de água e 0,1 L de acetona. A mistura é igualmente filtrada e o seu pH é ajustado a 5 com a mesma solução de NaOH. O restante procedimento é idêntico ao anterior.

O *loop* usado para dosear a quantidade injectada no sistema é igual para as duas colunas e tem capacidade de 100 µL. A aquisição dos dados é feita usando o mesmo software que os catiões. Contrariamente ao que acontece com os catiões, o intervalo de pH

recomendado para o uso das duas colunas dos aniões é mais largo pelo que estas podem são preparadas com água milli Q. (Schäfer, 1996)

As condições experimentais usadas para as duas colunas estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições experimentais usadas na análise qualitativa e quantitativa dos aniões.

	Curva Combinada	
	Análise Qualitativa	Análise Quantitativa
Coluna	IC Anion Column Metrosep Anion Dual 2	IC Anion Column Hamilton PRP-X100
Fluxo (mL/min)	0,7	1,2
Tempo corrida (min)	20	25
Eluente	5 mmol/L ácido ftálico, 2% acetonitrilo; pH =4,5	2 mmol/L ácido ftálico, 7,6 % acetona; pH=5

2.3.2.2 Padrões usados na validação dos métodos para a análise de aniões

O esquema de leitura de padrões usados para a validação das determinações de aniões foi o mesmo que foi referido para os catiões. Foram preparados dois PC diários contendo todos os aniões referidos para a validação da análise qualitativa e uma curva combinada de todos os aniões para a validação das medições quantitativas. Esta última contém todos os aniões referidos à excepção do carbonato. Foram também preparados, no dia da sua leitura, PC para o estudo da estabilidade da curva e um novo padrão para o estudo da estabilidade dos padrões. Todas as soluções e diluições foram feitas com água desionizada e a conservação destas foi realizada a cerca de 5°C.

Preparação das soluções mãe

No caso dos aniões, as soluções mãe diluídas foram preparadas a partir de soluções mãe a ≈ 1000 mg/L, excepto no caso do clorato e do carbonato em que a solução mãe foi preparada a partir dos respectivos sais. As massas pesadas são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Massas pesadas para a preparação das soluções mãe do clorato e do carbonato.

Sol. Mãe	ClO_3^-	CO_3^{2-}
m_{sal} pesada (g)	0,128	0,018
Conc. Anião (mg/L)	1003,52	101,91

Preparação dos padrões da curva calibração

A curva de calibração combinada dos aniões é composta por quatro níveis de concentração. Esta contém fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, clorato e sulfato. O esquema que se segue mostra a preparação da curva de calibração combinada (Fig.9):

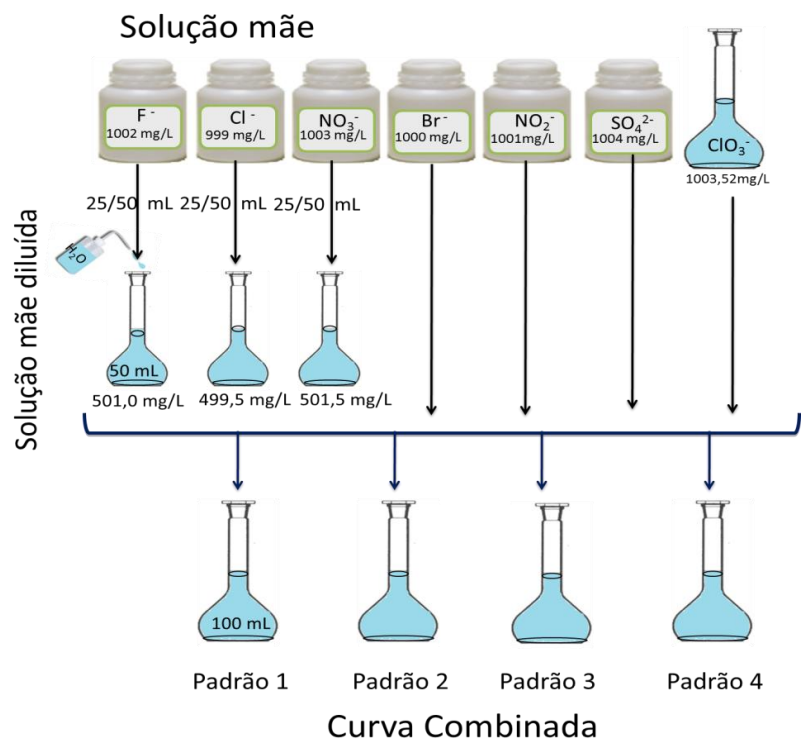


Fig.9 – Esquema de preparação da curva de calibração combinada usada na validação do procedimento quantitativo dos aniões.

As tomas tiradas para a preparação de 100 mL dos padrões combinados, segundo o esquema apresentado anteriormente, estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 – Tomas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação de 100 mL dos padrões da curva combinada dos aniões.

Curva Combinada							
Anião		F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ²⁻
Solução (mg/L)		501,0	499,5	501,5	1000,0	1001,0	1003,5
V Stock (µL)	Padrão 1	450	200	200	200	200	200
	Padrão 2	700	450	450	400	400	400
	Padrão 3	950	700	700	600	600	600
	Padrão 4	-	950	950	800	800	800

Todas as tomas são efectuadas utilizando uma micropipeta automática de 100-1000 μL .

Preparação dos padrões de controlo

De uma forma equivalente à realizada na medição de catiões, foram preparados diariamente dois PC para a validação da análise qualitativa dos aniões. Para isso foi também necessário preparar, soluções diluídas das soluções mãe, à excepção do cloreto e do carbonato nos quais se preparou uma nova solução mãe a partir do respectivo sal. As concentrações das novas soluções, assim como as tomas retiradas das mesmas para a preparação dos PC, estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Tomas retiradas das soluções mãe e mãe diluídas para a preparação dos PC usados na validação das medições qualitativas dos aniões.

		PC Combinado							
Anião		F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	ClO_3^{2-}	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}
Sol. usada		50,0	50,0	50,0	100,0	100,0	101,9	100,0	101,9
V stock (μL)	PC1	450	200	200	200	200	200	200	200
	PC2	950	950	950	800	800	800	800	800

Neste caso, os padrões usados para a validação qualitativa e para o estudo da estabilidade da curva são preparados da mesma forma.

2.4 Análise de Materiais de Referência Certificados

Para avaliar a exactidão dos métodos desenvolvidos e demonstrar que estes estão a reproduzir os resultados pretendidos, foram analisados materiais de referência certificados (MRC) com composição conhecida. No caso dos aniões foi usado um MRC da Fluka composto por 10 mg/kg $\pm 0,2\%$ de F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{2-} . Para os catiões foi também analisado um MRC Fluka igualmente com 10 mg/kg $\pm 0,2\%$ de Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ e Ca^{2+} .

2.5 Extracção de Amostras Reais

Depois de validados os métodos cromatográficos que serão usados para a análise das espécies iónicas constituintes de explosivos inorgânicos, estes foram testados através da análise de amostras reais que chegaram ao LPC. Antes de se proceder à análise propriamente dita, as amostras são submetidas ao protocolo de extracção em vigor para o efeito. O esquema que se segue (Fig.10) apresenta todos os passos que têm de ser realizados desde a chegada das amostras ao laboratório, passando pela sua preparação até à análise:

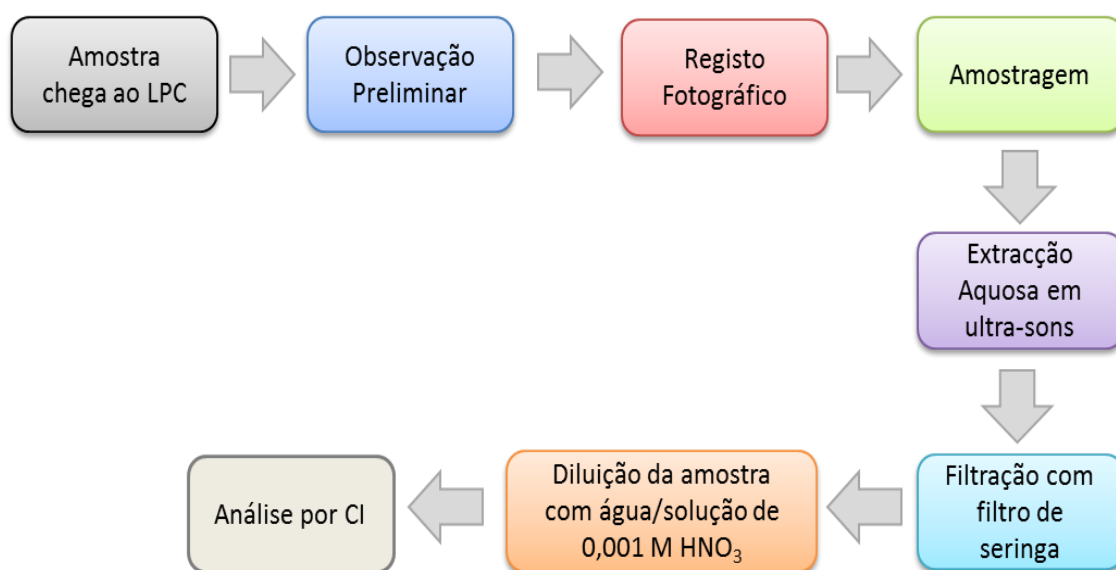


Fig.10 – Representação esquemática de todos os passos pelos quais as amostras têm de passar desde que chegam ao LPC até à determinação cromatográfica.







Como se pode ver pelo esquema anterior, depois da amostragem é feita a extracção dos compostos solúveis em água presentes na amostra em ultra-sons. Por fim, é feita uma filtração usando um filtro de seringa e a amostra é analisada por IC.

Acontece que, em muitos casos as amostras estão demasiado concentradas podendo este factor afectar as determinações. No caso da identificação dos analitos, a elevada concentração origina picos demasiado largos que podem mascarar os picos dos analitos com tempos de retenção próximos. Já no caso da quantificação, a concentração de um determinado analito presente na amostra deve estar incluída na gama de trabalho do método, de modo a evitar possíveis erros na determinação do seu teor. Desta forma, na

maior parte dos casos, é necessário efectuar uma diluição das amostras antes de estas serem analisadas. No caso dos aniões, essa diluição é feita com água purificada pelo sistema milli Q. Relativamente aos cations, tal como acontece na preparação dos padrões, é necessário recorrer a uma solução 0,001M de HNO_3 . As diluições são feitas por adição de um volume de amostra V_1 a um volume de “água”/ “solução ácida” V_2 , ao qual está associado um factor de diluição $F_v = \frac{V_1}{(V_1+V_2)}$. Nas amostras onde estão presentes mais de um anião/cation e a proporção entre eles é diferente, por vezes, é necessário fazer mais que uma diluição para que se consiga que os diversos teores estejam dentro da gama de trabalho do método quantitativo. Em alguns casos, a primeira diluição origina uma concentração muito elevada pelo que é necessário recorrer a diluições sucessivas, ou seja, faz-se uma 2ª Diluição a partir da 1ª Diluição.

A tabela 9, apresenta uma breve descrição das amostras reais analisadas neste trabalho, o modo como foram extraídas e as diluições que foram feitas para a análise quantitativa das espécies presentes em cada uma das amostras.

Tabela 9 - Descrição das amostras reais analisadas neste trabalho e diluições feitas para a análise quantitativa dos aniões e dos catiões

Amostra	Fotografia	Descrição	Amostragem	Análise de Aniões		Análise de Catiões	
				1ª Diluição	2ª Diluição	1ª Diluição	2ª Diluição
1		Seis embalagens plásticas de gemulit cor de rosa.	Foi retirada uma pequena quantidade de amostra do interior de uma embalagem	25 µL + 10 mL		25 µL + 10 mL	
						500 µL + 10 mL	
2		Petardo	A amostragem do material foi feita retirando um pouco do seu conteúdo	25 µL + 10 mL		100 µL + 10 mL	
				2 mL + 2 mL		1 mL + 5 mL	
3		Cordão Lento cor de rosa não deflagrado	Foi Retirada uma determinada quantidade de material que do seu conteúdo	20 µL + 10 mL		20 µL + 10 mL	
4		Gelamonite	Amostra foi directamente dissolvida em água	100 µL + 10 mL	1 mL+10mL	20 µL + 10 mL	-
5		Pólvora	Amostra foi directamente dissolvida em água	100 µL + 10 mL	1 mL+10mL	20 µL + 10 mL	-
6		Pólvora Grafitada	Amostra foi directamente dissolvida em água	20 µL + 10 mL	1 mL+10 mL	50 µL + 10 mL	1 mL+ 5 mL

3 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na sequência do trabalho experimental realizado assim como todas as estratégias desenvolvidas e testes realizados no tratamento destes dados. Em primeiro lugar serão apresentadas as estratégias de validação dos procedimentos de medição propostos para a análise qualitativa e quantitativa dos extractos aquosos de explosivos e os resultados obtidos durante a execução desses estudos. De seguida, será abordado o controlo interno da qualidade da medição baseado na leitura de padrões de controlo (PC) equivalentes aos de calibração, e no correspondente estudo de compatibilidade entre o teor estimado e o esperado do PC, que implica a avaliação da incerteza de medição pela abordagem “*bottom-up*”. Serão também apresentados os resultados obtidos na análise de Materiais de Referência Certificados, constituídos por grande parte dos iões em estudo, com vista a avaliar o desempenho de medição. Por fim, serão apresentados os resultados obtidos na análise das amostras reais, incluindo o balanço iónico dos analitos em solução. A qualidade deste balanço foi também avaliada por um estudo de compatibilidade da concentração molar de cargas positivas e negativas no extracto aquoso dos explosivos.

3.1 Validação do Desempenho Qualitativo

3.1.1 Estratégia de validação

A estratégia definida para a validação do desempenho qualitativo da identificação de aniões e catiões consiste na leitura de um replicado, de dois PC correspondentes às concentrações mais baixa e mais alta da gama de trabalho, durante dez dias. O tratamento dos resultados obtidos para os tempos de retenção (t_r) foi feito por uma análise de variâncias (ANOVA) de factor único, utilizando os suplementos do MS-Excel, permitindo assim, avaliar se existem diferenças significativas nas variâncias observadas de tempos de retenção entre dias (dois PC diferentes) e dentro de dias, através do cálculo das variâncias dos resultados obtidos nas duas condições. Com os dados do teste, mais precisamente com

a variância obtida para os tempos de retenção adquiridos no mesmo dia, ou seja, dentro de dias, é possível calcular o desvio padrão da repetibilidade (s_{rep}) que permite quantificar o limite de repetibilidade (r) através da equação 20.

$$r = 2,8 \times s_{rep} \quad (20)$$

Os r obtidos para os catiões e aniões são apresentados nas tabelas 10 e 11 respectivamente.

Tabela 10 - Limites de repetibilidade obtidos para os tempos de retenção dos catiões.

Catião	r (min)
Lítio	0,086
Sódio	0,092
Amônio	0,093
Potássio	0,099
Cálcio	0,328
Magnésio	0,403
Estrôncio	0,465
Bário	0,697

Tabela 11 - Limites de repetibilidade obtidos para os tempos de retenção dos aniões.

Anião	r (min)
Fluoreto	0,045
Cloreto	0,079
Nitrito	0,071
Brometo e Clorato	0,155
Nitrato	0,104
Sulfato	0,225
Carbonato	0,151

É com base no r estimado, que serão definidos critérios de aceitação dos tempos de retenção dos analitos presentes nos PC e nas amostras, que permitem testar a resposta do método em rotina.

3.2 Validação do Desempenho Quantitativo

O plano definido para a validação do desempenho quantitativo envolve o estudo da linearidade e gama de trabalho, homogeneidade de variâncias, limiares analíticos, estabilidade da curva e dos padrões de calibração, e avaliação da incerteza associada à determinação da composição iónica da fracção solúvel em água do explosivo.

3.2.1 Estratégia de validação

A curva de calibração, composta por quatro níveis de concentração, foi lida de 15 em 15 dias durante um mês. Na primeira leitura foram lidos 10 replicados do primeiro e do último padrão da curva e 4 replicados dos restantes. Com estes dados foi possível estudar a linearidade/gama de trabalho, a homogeneidade de variâncias da resposta instrumental e também avaliar a normalidade dos dados de cada nível de concentração. Nas restantes leituras de curvas todos os padrões foram lidos em triplicado. Durante este processo, foram lidos diariamente e com injeções únicas, dois PC preparados no dia, com concentrações correspondentes ao nível mais baixo e mais alto de concentração da gama de trabalho do método. Com este historial estudou-se a estabilidade da curva, definindo-se critérios de aceitação que serão abordados mais à frente. Para o estudo da estabilidade dos padrões nas condições de conservação definidas, foram lidos, alternadamente, e em condições de repetibilidade, dez replicados de um padrão conservado durante dois meses e de um padrão preparado no dia de ensaio. Por fim, para o estudo dos limiares analíticos foram preparadas soluções individuais de cada ião com uma concentração correspondente a um sinal instrumental equivalente a aproximadamente três vezes a razão sinal ruído. Estas foram lidas 10 vezes também em condições de repetibilidade.

3.2.2 Linearidade e gama de trabalho

O passo inicial do processo de validação foi a escolha da gama de trabalho que foi realizada considerando o objectivo do ensaio e tendo em conta a linearidade da recta obtida no gráfico da concentração em função da resposta instrumental.

As tabelas 12 e 13 apresentam as gamas de trabalho finais escolhidas para os diversos catiões e aniões respectivamente.

Tabela 12 – Gama de trabalho escolhida para os cátions.

Curva Combinada (mg/L)								Curva Bário
Padrão	Li ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
1	0,2	1	1	2	2	2	5	15
2	0,4	1,75	1,75	4	4	3,5	10	25
3	0,6	2,5	2,5	6	6	5	15	35
4	0,8	3,25	3,25	8	8	6,5	25	45

Tabela 13 – Gama de trabalho escolhida para os aniões.

Curva Combinada (mg/L)							
Padrão	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻
1	2,25	1	1	2	2	2	2
2	3,5	2,25	2,5	4	4	4	4
3	4,75	3,5	3,5	6	6	6	6
4	-	4,75	4,75	8	8	8	8

As figuras 11 e 12 apresentam um exemplo de um cromatograma de um padrão da curva combinada e da curva do bário, respectivamente.

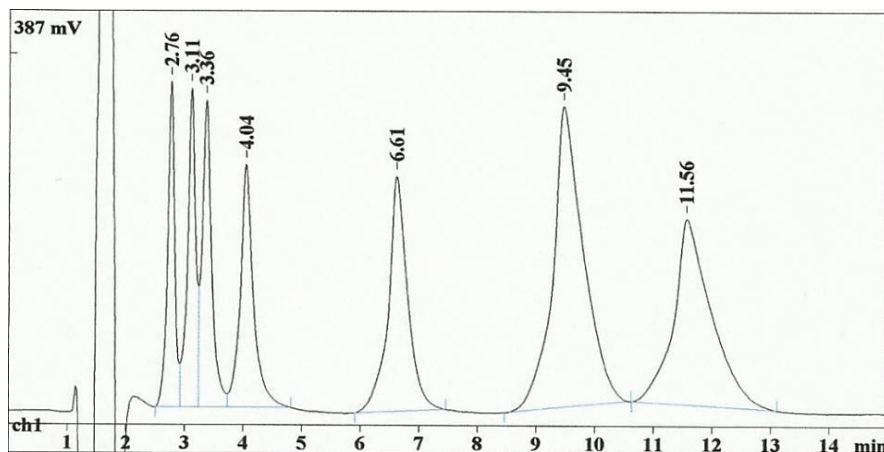


Fig.11 - Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível de concentração da gama de trabalho dos cátions, onde temos por ordem crescente de tempo de retenção o Lítio, Sódio, Amônio, Potássio, Cálcio, Magnésio e Estrôncio.

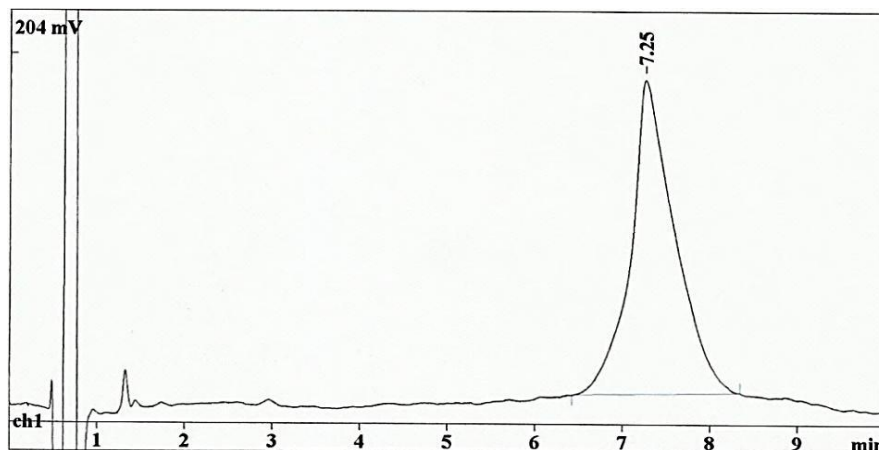


Fig.12 - Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível de concentração da gama de trabalho do Bário .

A figura que se segue apresenta um cromatograma típico de um padrão combinado dos aniões:

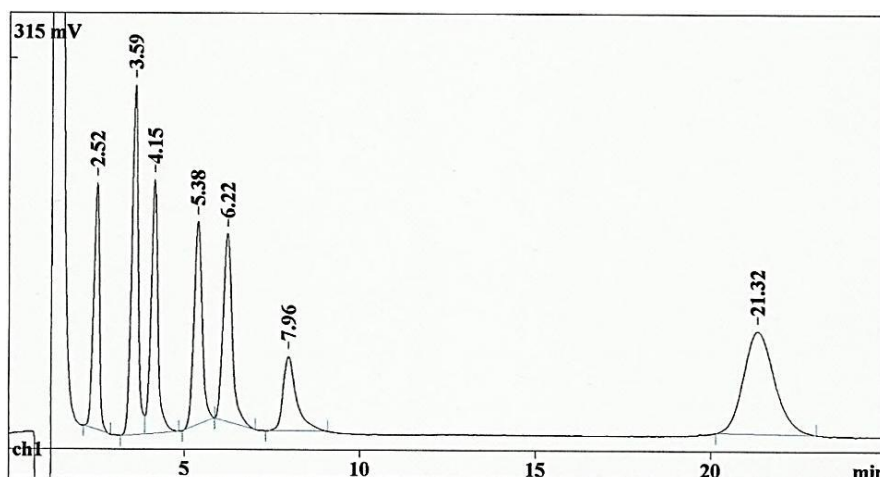


Fig.13 - Cromatograma típico da análise quantitativa do quarto nível concentração da gama de trabalho dos aniões, onde temos por ordem crescente de tempo de retenção Fluoreto, Cloreto, Nitrito, Brometo, Nitrato, Clorato e Sulfato.

A linearidade e a qualidade do ajuste à recta são avaliadas por ferramentas estatísticas escolhidas de acordo com o modelo de regressão candidato a descrever a melhor resposta instrumental. A estratégia usada para a escolha do modelo está descrita no ponto 1.3.2.1. A aplicação destas ferramentas tem como pressuposto da normalidade da distribuição das réplicas dos sinais instrumentais e a inexistência de valores aberrantes. Desse modo, depois de escolhida a gama de trabalho foi feita a primeira leitura da curva que permitiu estudar a normalidade dos dados, pela aplicação do método de Kolmogorov-Smirnov, utilizando o software SPSS Statistics, seguida da verificação da existência de valores aberrantes únicos ou emparelhados, recorrendo para tal aos testes de Grubbs e Grubbs

emparelhados. Verificou-se que todos os dados obtidos para catiões eram normais e que não existiam valores aberrantes. Relativamente aos aniões, os dados também se revelaram normais, no entanto, foi detectado um valor aberrante único para o cloreto que foi posteriormente eliminado.

De seguida, com esses mesmos resultados, foi feito um teste F às variâncias obtidas para o primeiro e último padrão com o objectivo de escolher o tipo de modelo linear que melhor poderá descrever a gama de calibração. Nas tabelas 14 e 15 são apresentados os valores das médias (\bar{x}), desvios padrão (s) e variâncias (s^2) dos sinais obtidos nas 10 leituras de cada um dos padrões referidos a partir das quais foi calculado o F_{cal} , e assim realizado o teste, para os catiões e aniões, respectivamente. O F_{crit} é obtido para $n-1$ graus de liberdade para o numerador e denominador e para um determinado nível de confiança ($F(n-1;n-1;95\%)$).

Tabela 14 - Resultados obtidos para o teste F realizado às variâncias obtidas nas dez primeiras leituras do primeiro e último padrão da curva combinada dos catiões e da curva do bário.

	Padrão	\bar{x}	s	s^2	F_{cal}	F_{crit}	Conclusão*
Lítio	1	712,42	19,94	397,66	4,49	3,18	Heterogéneo
	4	3029,13	42,26	1785,55			
Sódio	1	820,66	16,56	274,18	12,37	3,18	Heterogéneo
	4	3167,50	58,25	3392,65			
Amónio	1	1141,45	26,55	705,04	4,00	3,18	Heterogéneo
	4	3923,50	53,12	2821,44			
Potássio	1	1042,50	36,83	1356,18	1,47	3,18	Homogéneo
	4	4271,57	44,66	1994,49			
Cálcio	1	1626,55	41,51	1722,93	3,83	3,18	Heterogéneo
	4	6144,67	81,22	6596,71			
Magnésio	1	3839,56	72,69	5283,48	3,00	3,18	Homogéneo
	4	12134,0	126,07	15894,09			
Estrôncio	1	2426,58	56,45	3186,40	6,14	3,18	Heterogéneo
	4	9181,54	139,92	19577,36			
Bário	1	2159,24	86,00	7396,81	5,55	3,18	Heterogéneo
	4	6141,75	202,69	41082,01			

* **Heterogéneo** – Variância da resposta instrumental heterogénea.

Homogéneo – Variância da resposta instrumental homogénea.

Tabela 15 - Resultados obtidos para o teste F realizado às variâncias obtidas nas dez primeiras leituras do primeiro e último padrão da curva combinada dos aniões.

	Padrão	\bar{x}	s	s^2	$F_{cal.}$	$F_{crit.}$	Conclusão
Fluoreto	1	833,10	2,47	6,11	21,00	3,18	Heterogéneo
	3	1888,19	59,03	3494,35			
Cloreto	1	555,23	7,38	54,42	125,40	3,18	Heterogéneo
	4	3114,84	82,61	6824,16			
Nitrito	1	492,95	18,81	353,64	10,03	3,18	Heterogéneo
	4	2333,72	59,56	3547,67			
Brometo	1	599,62	16,86	284,14	8,24	3,18	Heterogéneo
	4	2426,21	48,38	2340,61			
Nitrato	1	615,13	16,30	265,71	11,69	3,18	Heterogéneo
	4	2559,66	55,73	3105,30			
Clorato	1	321,38	11,93	142,27	7,67	3,18	Heterogéneo
	4	1425,35	33,04	1091,54			
Sulfato	1	1136,40	83,30	6939,11	1,33	3,18	Homogéneo
	4	4530,52	96,11	9237,55			

Pela análise das tabelas verifica-se que de todos os iões, apenas a potássio, o magnésio e o sulfato apresentam uma resposta com dispersão homogénea, pelo que nestes casos será aplicado um modelo linear não ponderado. Os restantes casos, visto apresentarem uma resposta com dispersão heterogénea, vão ser descritos por modelos lineares ponderados.

A linearidade e qualidade do ajuste do modelo aos sinais foram estudadas pela aplicação dos testes ANOVA e de χ^2 , para as dispersões da resposta instrumental homogéneas e heterogéneas, respectivamente. Para todos os casos estudados, provou-se a linearidade da resposta instrumental em função da concentração de analito.

3.2.3 Limiares analíticos

Como foi visto no ponto 1.3.2.4 do capítulo 1, o cálculo dos limiares analíticos pode ser feito baseado nos parâmetros de regressão do modelo linear não ponderado quando a resposta é linear e homogénea em termos de variâncias. No entanto, quando não existe homogeneidade de variâncias ou a gama de trabalho está muito afastada do LD do aparelho, estes serão estimados por excesso. Para evitar que tal aconteça, os limiares analíticos

podem ser calculados usando os dados obtidos para dez leituras de soluções individuais, às quais corresponde um sinal instrumental de aproximadamente três vezes a razão sinal ruído, através da aplicação da equação 21.

$$L = \frac{K \times s}{b} \quad (21)$$

Onde K é substituído por 3 para o cálculo do LD e 10 para o LQ:

Onde o **b** será calculado por:

$$b = \frac{\text{média sinais}}{\text{concentração}} \quad (22)$$

Os resultados obtidos para os cátions e aniões são apresentados nas tabelas 16 e 17 respectivamente.

Tabela 16 - Desvio padrão e médias obtidas para os dez replicados lidos para cada um dos cátions e os respectivos limiares analíticos.

Catão	Li ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
Conc. (mg/L)	0,04	0,2	0,15	0,3	0,3	0,15	1	5
s	11,34	23,91	11,61	21,26	39,13	28,84	94,53	115,85
Média	101,79	147,33	74,66	171,38	245,18	237,02	455,41	741,73
b	22544,83	736,64	497,75	571,28	817,28	1580,14	455,41	148,35
LD	0,013	0,097	0,070	0,11	0,14	0,055	0,623	2,34
LQ	0,045	0,033	0,233	0,372	0,478	0,183	2,076	7,807

Tabela 17 - Desvio padrão e médias obtidas para os dez replicados lidos para cada um dos aniões e os respectivos limiares analíticos.

Anião	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Conc. (mg/L)	0,3	0,25	0,27	0,4	0,6	1,7	0,9
s	8,76	6,90	6,67	15,00	7,96	22,06	15,35
Média	78,86	59,56	122,70	135,20	159,70	226,20	454,95
b	262,86	238,24	454,38	337,97	266,12	133,08	505,50
LD	0,10	0,09	0,04	0,13	0,09	0,50	0,09
LQ	0,33	0,29	0,15	0,43	0,30	1,66	0,30

A determinação dos limiares analíticos permite conhecer quais as capacidades de detecção e quantificação da instrumentação usada.

3.2.4 Estudo da estabilidade da curva

Foi avaliada a estabilidade das curvas de calibração com o objectivo de verificar se estas produzem sinais concordantes ao longo do tempo e desse modo evitar a leitura de curvas diárias em rotina. Os resultados obtidos para os PC lidos diariamente ao longo do período da validação quantitativa foram interpolados na primeira leitura da curva de calibração, determinando-se assim a concentração de cada um dos analitos presentes nos mesmos. A avaliação da estabilidade é feita por um teste de compatibilidade entre o teor estimado e o esperado baseado nas respectivas incertezas.

O esquema geral de preparação dos padrões da curva e dos PC está representado na figura 14.

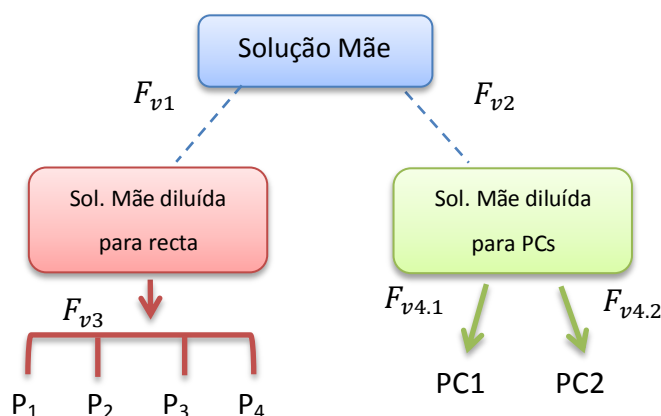


Fig.14 – Esquema geral de preparação dos padrões da curva de calibração e dos PC.

Incerteza associada ao teor do PC estimado por quantificação instrumental:

A incerteza associada ao teor de um analito estimado por interpolação do sinal instrumental na recta, x_0 , vai ter em conta a componente da preparação dos padrões da curva e a interpolação.

1) Preparação dos padrões

Para assegurar que os modelos de regressão são adequados para descrever os dados experimentais, foi verificada a irrelevância da incerteza associada ao teor relativo dos padrões de calibração considerando a repetibilidade da resposta instrumental. A tabela 18 apresenta a incerteza padrão relativa máxima associada à razão da concentração dos padrões de calibração do lítio e a repetibilidade relativa mínima associada à resposta

instrumental. Pode-se constatar, através da aplicação do teste F , que a repetibilidade relativa é pelo menos, três vezes inferior à incerteza relativa da razão da concentração dos padrões.

Tabela18 – Incerteza padrão relativa máxima associada à razão da concentração dos padrões de calibração do lítio, repetibilidade relativa mínima associada à resposta instrumental e resultado do teste F entre ambas.

Padrão	$V_{i\text{ mãe}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{final}} (\text{mL})$	F_v	$u_{F_v} (\%)$	$u_{F_{vn}/F_{vn+1}} (\%)$	$s' (\%)$	$s'/3 (\%)$	Teste F
1	200	100	0,0020	0,53	0,61	2,80	0,93	OK
2	400	100	0,0040	0,30	0,45	0,74	0,25	OK
3	600	100	0,0060	0,34	0,43	2,46	0,82	OK
4	800	100	0,0080	0,27		1,39	0,46	OK

Desse modo, a incerteza associada às diluições das soluções mãe para a preparação dos padrões da curva, F_{v3} , é desprezável pelo que neste cálculo não será considerada essa componente. No entanto, nos casos em que é usada a mesma pipeta de 5 mL, como a componente da calibração não foi considerada anteriormente pois era anulada, aqui terá ser contabilizada. Esta é calculada pela equação 23.

$$u_{tol\ 5mL} = \frac{Tolerância}{\sqrt{6}} \quad (23)$$

Sendo “*Tolerância*” a tolerância associada ao valor nominal do material de vidro e assumindo uma distribuição triangular.

Como foi referido no capítulo 2, em alguns casos foi necessário recorrer a uma diluição da solução mãe, associada ao factor de diluição F_{v1} , antes da diluição para a obtenção dos padrões da calibração. Quando isso acontece, a incerteza associada a essa diluição tem de ser considerada e o seu cálculo é feito pela aplicação da equação 24. (IPAC, 2007)

$$\frac{u_{F_v}}{F_v} = \sqrt{\frac{(u_{V_i}^{cal})^2 + (u_{V_i}^{rep})^2}{V_i^2} + \frac{(u_{V_f}^{cal})^2 + (u_{V_f}^{rep})^2}{V_f^2}} \quad (24)$$

Os diversos termos necessários para a aplicação da expressão anterior serão explicados mais à frente no ponto referente ao cálculo das incertezas no ponto 3.2.8.

A incerteza associada à concentração da solução mãe é excluída deste controlo da qualidade porque a mesma solução mãe é usada na preparação dos padrões da curva de calibração e controlo.

2) Interpolação na recta

Quando os pressupostos do modelo de regressão são válidos no que respeita à linearidade, comportamento da variância da resposta instrumental (homogeneidade ou heterogeneidade de variâncias) e incerteza associada ao teor relativo dos padrões de calibração for significativamente inferior à precisão da resposta instrumental, a incerteza associada à interpolação pode ser estimada pelo modelo de regressão. Esta combina as incertezas associadas à calibração instrumental e à repetibilidade da leitura do sinal da amostra e é dada pelo desvio padrão associado a x_0 , s_{x0} , no caso dos modelos não ponderado e s_{xow} , quando é aplicado o modelo ponderado. Estes vão ser calculados aplicando as equações 11 e 17, respectivamente. (IPAC, 2007)

3) Combinação das componentes de incerteza

Combinando as incertezas referidas, a fórmula geral para o cálculo da incerteza padrão relativa associada ao teor do analito no PC estimado por interpolação na recta (u'_{x0}), no caso do modelo não ponderado, é dado pela equação 25.

$$u'_{x0} = \sqrt{\left(\frac{s_{x0}}{x_0}\right)^2 + (u'_{Fv1})^2 + (u'_{tol\ 5mL})^2} \quad (25)$$

Incerteza associada ao teor do PC esperado pela sua preparação

O teor dos padrões estimado pela sua preparação, C_{PCPrep} , é calculado tendo em conta todas as diluições que foram feitas desde a solução mãe até ao PC. A incerteza final associada a essa concentração tem em conta a diluição efectuada para a solução mãe diluída, quando esta é feita, associada ao factor de diluição F_{v2} , e as diluições associadas às tomas retiradas das mesmas para a preparação dos PC, associadas ao factor de diluição F_{v4} . Combinando as duas fontes, a incerteza padrão final relativa associada ao teor esperado ($u'_{C_{PCPrep}}$) é calculada através da equação 26.

$$u'_{C_{PCPrep}} = \sqrt{(u'_{Fv2})^2 + (u'_{Fv4})^2} \quad (26)$$

Compatibilidade Metrológica

O critério de aceitação do teor do analito no PC estimado por interpolação, x_0 , é dado pela equação 27.

$$|x_0 - C_{PCPrep}| \leq 2 \times \sqrt{(u'_{x_0} \times x_0)^2 + (u'_{CPCPrep} \times C_{PCPrep})^2} \quad (27)$$

Como está associado um número de graus de liberdade efectivo elevado, é utilizado o factor 2 ao qual está associado um nível de confiança de 95%.

Quando se verifica o critério anterior, o teor do PC é aceite e a curva pode-se considerar estável durante pelo menos o intervalo de tempo que medeia entre a leitura da curva e do PC em causa. Se, pelo contrário, o critério falhar, a curva não é estável e em rotina terá de ser feita uma curva diária ou menos espaçada no tempo.

Para tornar mais perceptível o estudo realizado segue-se, a título de exemplo o caso da avaliação da estabilidade da curva de lítio. O esquema de preparação dos padrões da curva e dos PC, a partir da solução mãe, assim como o material volumétrico usado para esse efeito, estão apresentados na figura seguinte:

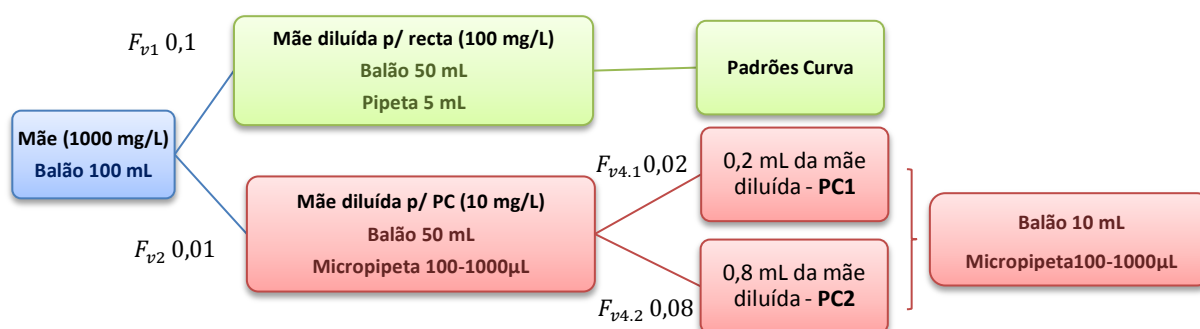


Fig.15 – Esquema de preparação e material volumétrico usado na preparação da curva de calibração e dos PC.

A tabela 19 apresenta os resultados obtidos para os quatro primeiros replicados da primeira leitura da curva do lítio.

Tabela 19 – Sinais instrumentais do lítio obtidos nos quatro replicados da primeira leitura da curva combinada dos catiões.

Padrão	Conc. (mg/L)	Replicado			
		1	2	3	4
1	0,1999	670,1	713,7	692,0	729,8
2	0,3998	1468,0	1478,8	1492,8	1488,5
3	0,5997	2240,9	2168,5	2241,2	2303,1
4	0,7996	3024,0	2993,1	3090,5	3055,2

Para determinar o teor de lítio presente nos PC lidos durante o processo de validação foram determinados os parâmetros da linha de regressão do modelo linear ponderado, b_w e a_w a partir das equações 13 e 14 respectivamente, usando os dados anteriores. Para tal foi necessário calcular o factor de ponderação w_i associado a cada x_i assim como o centroide ponderado através das equações 12, 15, e 16. Os resultados obtidos para os diversos parâmetros são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Valores dos factores de ponderação w_i associados a cada x_i e cálculos intermédios necessários para a determinação da ordenada na origem e declives ponderados e respectivos valores obtidos.

Padrão	S_i	S_i^{-2}	W_i	$W_i x_i (\text{mg/L})$	$W_i \bar{y}_i$	$W_i x_i y_i (\text{mg/L})$	$W_i x_i^2 (\text{mg/L})^2$	$W_i \bar{y}_i^2$
1	25,969	0,0015	0,559	0,112	391,747	78,310	0,022	$2,748 \times 10^5$
2	11,021	0,0082	3,101	1,240	4595,959	1837,611	0,496	$6,811 \times 10^6$
3	55,015	0,0003	0,124	0,075	278,576	167,075	0,045	$6,236 \times 10^5$
4	41,764	0,0006	0,216	0,173	656,645	525,096	0,138	$1,997 \times 10^6$
Soma		0,0106		0,400	1480,732	2608,092	0,701	$9,706 \times 10^6$
Declive							3891,335 (L/mg)	
Ordenada na Origem							-74,718	

O teor de lítio é estimado por interpolação do sinal instrumental do PC na curva ponderada determinada anteriormente. A tabela 21 apresenta os sinais obtidos para a leitura dos primeiros PC lidos durante a validação, dez dias após a leitura da curva, assim como a respectiva concentração obtida por interpolação.

Tabela 21 - Sinais obtidos para a leitura dos primeiros PC lidos durante a validação e a respectiva concentração obtida por interpolação.

PC	t_r	Área	$x_o (\text{mg/L})$
PC1	2,72	701,81	0,200
PC2	2,77	3023,33	0,796

Para determinar a incerteza associada a x_o temos que considerar a incerteza associada à diluição da solução mãe inicial, obtida pela equação 24, e a associada à interpolação na recta, calculada pela equação 17. Em anexo encontram-se os valores da repetibilidade e calibração do material usado necessários à aplicação da equação 24.

A tabela 22 apresenta os resultados obtidos para as componentes referidas, assim como a incerteza padrão relativa final que afecta o resultado estimado obtida por combinação das duas componentes.

Tabela 22 – Incerteza padrão relativa, u'_{x_0} , associada ao teor estimado de lítio no PC e respectivas componentes de incerteza.

PC	$s_{x_{0w}}$	$s_{x_{0w}}/x_0$	u_{vi1}^2/V_{i1}^2	u_{vf1}^2/V_{f1}^2	u_{Fv1}	u'_{x_0}
1	0,0078	0,0389	$8,27 \times 10^{-6}$	$7,92 \times 10^{-7}$	$3,01 \times 10^{-3}$	0,039
2	0,0129	0,0162	$8,27 \times 10^{-6}$	$7,92 \times 10^{-7}$	$3,01 \times 10^{-3}$	0,016

Segue-se a determinação da concentração de lítio esperada, obtida pela preparação dos PC lidos tendo em conta as diluições efectuadas. A tabela 23 apresenta os dados necessários a essa determinação assim como os resultados obtidos.

Tabela 23 - Dados necessários para o cálculo da concentração esperada dos PC e os respectivos resultados.

Dados preparação mãe a 1000mg/L		Conc. Mãe (mg/L)	PC	F_{v2}	F_{v4}	C_{PCPrep} (mg/L)
m pesada (mg)	99,96	999,58	1	0,01	0,02	0,1999
Volume (L)	0,10		2		0,08	0,7996

Pelo esquema de preparação dos padrões (Fig. 14) é possível ver que as fontes de incertezas responsáveis por desvios entre C_{PCPrep} e x_0 , que afectam a C_{PCPrep} , são as duas diluições que foram efectuadas durante a preparação do PC, calculadas pela equação 24.

Desta forma, os resultados obtidos são apresentados na tabela 24.

Tabela 24 - Incerteza padrão relativa, $u'_{CPCPrep}$, associada ao teor de lítio do PC estimado pela sua preparação e respectivas componentes de incerteza.

PC	u_{vi2}^2/V_{i2}^2	u_{vf2}^2/V_{f2}^2	u_{Fv2}	u_{vi4}^2/V_{i4}^2	u_{vf4}^2/V_{f4}^2	u_{Fv4}	$u'_{CPCPrep}$
1	$1,68 \times 10^{-5}$	$7,92 \times 10^{-7}$	$4,19 \times 10^{-3}$	$3,39 \times 10^{-5}$	$3,05 \times 10^{-6}$	$6,08 \times 10^{-3}$	0,007
2	$1,68 \times 10^{-5}$	$7,92 \times 10^{-7}$	$4,19 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-5}$	$3,05 \times 10^{-6}$	$4,22 \times 10^{-3}$	0,006

Com os teores de lítio estimado e esperado e as respectivas incertezas padrão é aplicada a equação 27, que permite avaliar se a curva é ou não estável com o tempo.

Os resultados obtidos para o estudo da estabilidade da curva de calibração do lítio, realizado com um PC lido dez dias após a leitura da curva, assim como os dos restantes analitos são apresentados nas tabelas 25 e 26, para os catiões e aniões, respectivamente.

Tabela 25 - Resultados obtidos para o estudo de estabilidade feito com o primeiro PC lido durante a validação, dez dias após a leitura da curva combinada dos catiões.

Catião	PC	Área	$u'x_0$	$u'_{CPCPrep}$	x_0	C_{PCPrep}	Teste
Lítio	1	701,8	0,039	0,007	0,200	0,199	Aceite
	2	3023,3	0,016	0,006	0,796	0,799	Aceite
Sódio *	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
Amónio	1	1118,3	0,023	0,007	0,988	1,002	Aceite
	2	3963,4	0,020	0,005	3,301	3,255	Aceite
Potássio	1	1054,5	0,037	0,173	2,038	2,003	Aceite
	2	4302,9	0,009	0,017	8,104	8,012	Aceite
Cálcio	1	1542,5	0,040	0,007	1,892	1,998	Aceite
	2	6050,0	0,016	0,005	7,845	7,994	Aceite
Magnésio	1	3828,3	0,031	0,017	1,964	1,999	Aceite
	2	11736	0,010	0,017	6,265	6,499	Aceite
Estrôncio	1	2315,9	0,054	0,010	4,768	5,010	Aceite
	2	9068,9	0,021	0,005	19,816	20,039	Aceite
Bário	1	1982,4	0,092	0,005	14,010	15,055	Aceite
	2	5832,5	0,040	0,004	44,568	45,166	Aceite

* Não são apresentados resultados de determinação de sódio visto que estes foram afectados por contaminações de analito.

Como os padrões de controlo e os da curva de calibração foram preparados a partir da mesma solução mãe, a contaminação de sódio não afecta os resultados obtidos para a validação. Posteriormente, para a quantificação dos analitos presentes nas amostras em estudo, foi preparada uma nova curva combinada de catiões usando soluções novas.

Os resultados anteriores mostram que os teores estimados no primeiro PC lido durante o processo de validação são aceites. No entanto, com o passar do tempo começou-se a observar desvios entre C_{PCPrep} e x_0 não justificáveis pela incerteza da quantificação por IC ou preparação dos padrões.

Tabela 26 - Resultados obtidos para o estudo de estabilidade feito com o primeiro PC lido durante a validação dos aniões.

Anião	PC	Área	$u'x_0$	$u'_{CPCPrep}$	x_0	C_{PCPrep}	Teste
Fluoreto	1	972,3	0,004	0,005	2,572	2,255	Falha
	2	2200,1	0,019	0,005	5,369	4,760	Falha
Cloreto	1	640,4	0,021	0,007	1,090	0,999	Falha
	2	3672	0,035	0,005	5,450	4,745	Falha
Nitrito	1	622,7	0,048	0,007	1,247	1,003	Falha
	2	2761	0,016	0,005	5,503	4,764	Falha
Brometo	1	667,0	0,022	0,007	2,179	2,000	Falha
	2	2754,7	0,020	0,005	8,950	8,000	Falha
Nitrato	1	647,1	0,029	0,007	2,078	2,002	Aceite
	2	2819,9	0,022	0,005	8,701	8,008	Falha
Clorato	1	359,6	0,063	0,006	2,232	2,038	Aceite
	2	1544,4	0,035	0,004	8,629	8,153	Aceite
Sulfato	1	1158,7	0,476	0,004	1,947	2,008	Aceite
	2	4946,0	0,110	0,004	8,672	8,032	Aceite

Contrariamente ao que acontecia com os catiões, no caso dos aniões desde o início foi verificada a falta de estabilidade da curva.

O estudo mostrou que quando o PC e a curva não são lidos no mesmo dia, frequentemente o teor de um determinado analito estimado por essa curva não é concordante com o esperado pela sua preparação. Durante o processo de validação foi verificada uma grande dispersão de resultados obtidos da leitura dos mesmos padrões em condições de precisão intermédia. Isto deve-se à grande variabilidade da resposta do cromatógrafo observada ao longo do tempo, aliada à variação da força iónica e pH da fase móvel, quando há mudança de eluente. Deste modo, conclui-se que a quantificação de analitos presentes nas amostras desconhecidas deverá ser feita com base numa curva de calibração diária.

3.2.5 Estudo da estabilidade dos padrões

Para testar se os padrões da curva se degradam com o tempo, nas condições de conservação definidas, testou-se se os sinais de dez réplicas do padrão usado na validação (P_{Velha}), conservado no frigorífico a uma temperatura de cerca de 5°C, e de um padrão preparado dois meses depois, nas mesmas condições (P_{Novo}), são significativamente diferentes. Para isso é aplicado um teste t que vai comparar as médias obtidas nos dois casos. A aplicação deste teste implica verificar previamente se os desvios padrão das leituras replicadas dos padrões são significativamente diferentes. Esta avaliação é feita recorrendo à aplicação de um teste F às respectivas variâncias. Considerando que os desvios padrão obtidos não são significativamente diferentes, o teste t é realizado aplicando a seguinte equação:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (28)$$

Onde t_{cal} é o valor calculado, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias dos dois padrões e s o desvio padrão estimado pela equação 29.

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (29)$$

Sendo s_1 e s_2 os desvios padrão dos dois conjuntos de sinais.

Se $t_{cal} \leq t_{crit.}$, as médias não são significativamente diferentes, o que significa que os padrões da curva são estáveis por pelo menos dois meses. Caso contrário, os padrões não são estáveis, pelo que, terá de ser preparada uma nova mãe e, consequentemente, um novo conjunto de padrões de calibração cada vez que for necessário quantificar o ião em causa. Os resultados obtidos para os dois testes realizados são apresentados na tabela 27 no caso dos catiões e na tabela 29 no caso dos anões. (Miller, 2005)

Tabela 27 - Resultados do teste *F*, aplicado às variâncias, e do teste *t*, aplicado às médias das dez leituras dos dois padrões de catiões usados no estudo de estabilidade das soluções.

	Padrão	$\bar{x}_{\text{Área}}$	Variância	Teste <i>F</i>			Teste <i>t</i>		
				<i>F</i> _{cal.}	<i>F</i> _{crit.}	Concl.	<i>t</i> _{cal.}	<i>t</i> _{crit.}	Concl.
Lítio	P _{Velho}	1400,6	5765,1						
	P _{Novo}	1391,3	4876,7	1,182	3,179	Eq.	0,28	2,88	Eq.
Sódio	P _{Velho}	1528,5	292,4						
	P _{Novo}	1529,2	226,8	1,289	3,179	Eq.	0,10	2,88	Eq.
Amônio	P _{Velho}	1929,1	4781,8						
	P _{Novo}	1906,0	4507,3	1,061	3,179	Eq.	0,76	2,88	Eq.
Potássio	P _{Velho}	1933,3	1927,1						
	P _{Novo}	9660,2	7031,9	1,374	3,179	Eq.	0,15	2,88	Eq.
Cálcio	P _{Velho}	3002,0	3987,1						
	P _{Novo}	2999,8	3519,3	1,133	3,179	Eq.	0,08	2,88	Eq.
Magnésio	P _{Velho}	6479,4	21663,5						
	P _{Novo}	6470,4	12039,3	1,799	3,179	Eq.	0,16	2,88	Eq.
Estrôncio	P _{Velho}	4561,1	16309,8						
	P _{Novo}	4437,7	12616,2	1,293	3,179	Eq.	2,30	2,88	Eq.
Bário	P _{Velho}	3585,3	3309,6						
	P _{Novo}	71028,5	67249,2	1,056	3,179	Eq.	2,35	2,88	Eq.

Concl.: Conclusão do teste;

Eq.: Equivalente – Estatisticamente equivalente para um nível de confiança de 95%;

Dif.: Diferente - Estatisticamente diferente para um nível de confiança de 95%.

Tabela 28 - Resultados do teste F , aplicado às variâncias, e do teste t , aplicado às médias das dez leituras dos dois padrões de aniões usados no estudo de estabilidade das soluções.

	Padrão	$\bar{x}_{\text{Área}}$	Variância	Teste F			Teste t		
				$F_{\text{cal.}}$	$F_{\text{crit.}}$	Concl.	$t_{\text{cal.}}$	$t_{\text{crit.}}$	Concl.
Fluoreto	P _{Velho}	707,3	807,1						
	P _{Novo}	671,8	631,2	1,279	3,179	Eq.	2,97	2,88	Dif.
Cloreto	P _{Velho}	1360,1	260,4						
	P _{Novo}	1351,9	302,6	0,861	3,179	Eq.	1,10	2,88	Eq.
Nitrito	P _{Velho}	1080,3	322,6						
	P _{Novo}	1108,3	1125,4	0,287	3,179	Eq.	-2,32	2,88	Eq.
Brometo	P _{Velho}	1052,7	171,7						
	P _{Novo}	1049,7	383,3	0,448	3,179	Eq.	0,40	2,88	Eq.
Nitrato	P _{Velho}	1084,5	289,2						
	P _{Novo}	1099,7	580,7	0,498	3,179	Eq.	-1,63	2,88	Eq.
Clorato	P _{Velho}	566,5	3023,3						
	P _{Novo}	566,9	3064,2	0,987	3,179	Eq.	-0,02	2,88	Eq.
Sulfato	P _{Velho}	2024,4	3135,0						
	P _{Novo}	1905,7	220328,2	0,014	3,179	Eq.	0,79	2,88	Eq.

Como é possível ver nos resultados apresentados nas tabelas anteriores, apenas para o fluoreto foi obtido $t_{\text{cal.}} > t_{\text{crit.}}$, pelo que este mostrou não ser estável com o tempo nas condições de conservação definidas. Desse modo, quando for necessário fazer a sua quantificação terá de ser preparada uma nova mãe de onde serão tiradas as tomas necessárias para a preparação de uma nova curva de calibração.

3.2.6 Determinação do factor de ponderação em rotina

Como já foi referido, quando a resposta instrumental é descrita pelo modelo linear ponderado, é necessário determinar os parâmetros de regressão ponderados, que implica o cálculo do factor de ponderação dos sinais obtidos para os vários níveis de concentração. A equação 12, mostra que o cálculo do factor de ponderação é feito considerando o desvio padrão dos resultados. Durante o processo de validação constatou-se que as curvas de calibração não são estáveis com o tempo, pelo que, em rotina, a quantificação terá de ser feita com base numa curva diária. Tendo em conta que em rotina não serão lidos replicados

suficientes para a determinação de um desvio padrão, foi necessário desenvolver um modelo que permita definir o factor de ponderação, w_i , associado a cada x_i , com base nos sinais replicados reunidos, em condições de repetibilidade e tendo em conta a relação existente entre o desvio padrão da resposta instrumental e a concentração do analito. Esta relação é avaliada usando os dados da primeira curva obtida durante a validação que envolve a realização de um número elevado de medições replicadas impraticável em ensaios em rotina. Para isso traçaram-se os gráficos do desvio padrão absoluto, s , e do desvio padrão relativo, s' , em função da concentração e avaliou-se a existência de uma relação linear através do coeficiente de correlação de Pearson. Definiu-se como critério que quando se obtém $r^2 \geq 0,8$ é usada a relação linear, entre s vs concentração ou s' vs concentração, caso contrário, habitualmente, assume-se que s ou s' são constantes. Os resultados obtidos para os vários analitos em estudo são apresentados na tabela 29.

Tabela 29 – Relação entre o desvio padrão absoluto, s , ou relativo, s' , e a concentração para os vários analitos em estudo e equações da recta nos casos onde se verificar uma relação linear.

Ião	Relação Estudada	r^2	Relação	Equação da recta
Fluoreto	s vs conc.	0,992	Linear	$22,577x - 49,880$
Cloreto	s vs conc.	0,848	Linear	$17,602x - 5,089$
Nitrito	s vs conc.	0,803	Linear	$9,300x + 17,272$
Brometo	s vs conc.	0,958	Linear	$5,576x + 3,272$
Nitrato	s vs conc.	0,942	Linear	$6,655x - 0,959$
Clorato	s vs conc.	0,959	Linear	$3,437x + 6,759$
Lítio	s' vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-
Sódio	s vs conc.	0,997	Linear	$18,496x - 2,765$
Amónio	s' vs conc.	0,860	Linear	$-0,004x + 0,028$
Potássio	s' vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-
Cálcio	s' vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-
Magnésio	s' vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-
Estrôncio	s' vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-
Bário	s vs conc.	$\leq 0,8$	Constante	-

Quando se verifica que existe uma relação constante entre o desvio padrão relativo do sinal, s' , e a concentração, o factor de ponderação, w_i , associado a cada x_i , vai ser calculado com base nas concentrações dos padrões da curva como demonstra a seguinte equação:

$$\begin{aligned}
 w_i &= \frac{1/s_i^2}{\left(\sum \frac{1}{s_i^2}/n\right)} = \frac{\left(\frac{1}{s'^2 \times c_i^2}\right)}{\frac{\left(\frac{1}{s'^2 \times c_1^2}\right) + \left(\frac{1}{s'^2 \times c_2^2}\right) + \left(\frac{1}{s'^2 \times c_3^2}\right) + \left(\frac{1}{s'^2 \times c_4^2}\right)}{4}} \\
 &= \frac{\left(\frac{1}{s'^2}\right) \times \left(\frac{1}{c_i^2}\right)}{\left(\frac{1}{n}\right) \times \left(\frac{1}{s'^2}\right) \times \left(\frac{1}{c_1^2} + \frac{1}{c_2^2} + \frac{1}{c_3^2} + \frac{1}{c_4^2}\right)} \Leftrightarrow w_i = \frac{1/c_i^2}{\left(\sum \frac{1}{c_i^2}/n\right)}
 \end{aligned}
 \tag{30}$$

Onde ci é a concentração associada a cada um dos padrões que constitui a curva de calibração.

Quando, por outro lado, a relação entre o desvio padrão absoluto e a concentração do analito é linear, os desvios padrão correspondentes a cada concentração são calculados pela equação da recta obtida durante a avaliação da relação existente entre o desvio padrão da resposta instrumental e a concentração do analito, e o factor de ponderação w_i é dado pela seguinte equação:

$$w_i = \frac{1/s_i^2}{\left(\sum \frac{1}{s_i^2}/n\right)} = \frac{1/(bc_i + a)}{\left(\sum \frac{1}{(bc_i + a)^2}/n\right)}
 \tag{31}$$

Onde b e a são, respectivamente, o declive e a ordenada na origem da regressão linear da concentração em função do desvio padrão absoluto da resposta instrumental.

Em alguns casos verifica-se que a relação é linear entre o desvio padrão relativo e a concentração. Nesses casos o valor que se obtém a partir da equação da recta é o desvio padrão relativo, pelo que, para se poder aplicar a expressão anterior este tem de ser convertido a absoluto multiplicando o primeiro pela respectiva concentração ($s' \times$ concentração).

3.2.7 Avaliação do desempenho de calibrações diárias realizadas com um ou dois replicados

Com o objectivo de definir quantos replicados da curva serão feitos diariamente em rotina, testou-se se os resultados das quantificações realizadas com base em apenas um replicado da curva diária diferem dos obtidos lendo dois replicados. Para isso, foram lidos, em condições de repetibilidade, dois replicados da curva de calibração e dois PC segundo o esquema apresentado na figura 16.



Fig.16 - Esquema de injeção usado para testar a qualidade de calibrações realizadas com leituras únicas ou duplicadas dos padrões de calibração.

O teste baseou-se num estudo de compatibilidade semelhante ao realizado no estudo da estabilidade da curva, que envolve o teor esperado e o estimado do analito no PC e as respectivas incertezas. Para isso, foi determinado o teor estimado no PC usando apenas um replicado da curva diária e também usando os dois replicados, através da determinação dos parâmetros ponderados nas mesmas condições. No primeiro caso temos um total de n leituras e no segundo teremos $2n$ leituras associadas a cada x_i . A avaliação dos teores obtidos é feita aplicando a equação 32 aos dois casos. Se os resultados estimados e esperados não forem compatíveis, prova-se que a calibração efectuada é inadequada.

$$|x_0 - C_{PCPrep}| \leq t(99; n - 2) \times \sqrt{(u'x_0 \times x_0)^2 + (u'_{CPCPrep} \times C_{CPCPrep})^2} \quad (32)$$

A título de exemplo apresenta-se o estudo feito para o caso do lítio. Os resultados dos dois replicados da curva lida no dia em que foi realizado o estudo são apresentados na tabela 30.

Tabela 30 – Sinais de leituras replicadas de padrões de calibração de lítio.

Conc. Padrão (mg/L)	Área	
	Rep ₁	Rep ₂
0,1999	619,558	620,129
0,3998	1394,343	1374,862
0,5997	2155,908	2063,207
0,7997	2874,108	2791,216

Tendo em conta que, no caso do lítio a precisão relativa dos sinais instrumentais é constante na gama da calibração, foi usada a equação 30 para estimar o w_i associado a cada x_i . Posteriormente, estes factores de ponderação foram associados a sinais únicos ou duplicados de padrões de calibração, para determinar os parâmetros da regressão ponderada nas mesmas condições. As tabelas 31 e 32 mostram os resultados obtidos assim como os cálculos intermédios necessários a essas duas determinações, respectivamente.

Tabela 31 - Factores de ponderação determinados e cálculos intermédios para o cálculo dos parâmetros de regressão ponderados, com sinais únicos, e respectivos valores obtidos considerando uma curva de calibração.

x_i (mg/L)	y_i	W_i	Wix_i (mg/L)	Wiy_i	$Wixiy_i$ (mg/L)	Wix_i^2 (mg/L) ²	Wiy_i^2
0,1999	619,558	2,810	0,562	1740,890	348,004	0,112	1,079×10 ⁶
0,3998	1394,343	0,702	0,281	979,331	391,568	0,112	1,366×10 ⁶
0,5997	2155,908	0,312	0,187	672,988	403,623	0,112	1,451×10 ⁶
0,7997	2874,108	0,176	0,140	504,665	403,562	0,112	1,450×10 ⁶
Soma		4,000	1,170	3897,874	1546,757	0,449	5,345×10 ⁶
Ordenada Origem						-138,740	
Declive						3805,342 (L/mg)	
Desvio Padrão Residual						12,608	

Tabela 32 - Factores de ponderação determinados e cálculos intermédios para o cálculo dos parâmetros de regressão ponderados, com sinais duplicados, e respectivos valores obtidos considerando uma curva de calibração do lítio.

x_i (mg/L)	y_i	W_i	Wix_i (mg/L)	Wiy_i	$Wixiy_i$ (mg/L)	Wix_i^2 (mg/L) ²	Wiy_i^2
0,1999	619,558	2,810	0,561	1740,889	348,003	0,112	1,079×10 ⁶
0,3998	1394,343	0,702	0,280	979,330	391,567	0,112	1,366×10 ⁶
0,5997	2155,908	0,312	0,187	672,988	403,623	0,112	1,451×10 ⁶
0,7997	2874,108	0,176	0,140	504,664	403,562	0,112	1,450×10 ⁶
0,1999	620,129	2,810	0,561	1742,494	348,324	0,112	1,081×10 ⁶
0,3998	1374,862	0,702	0,280	965,648	386,097	0,112	1,328×10 ⁶
0,5997	2063,207	0,312	0,187	644,050	386,268	0,112	1,329×10 ⁶
0,7997	2791,216	0,176	0,140	490,109	391,923	0,112	1,368×10 ⁶
Soma		8,000	2,340	7740,176	3059,370	0,898	1,045×10 ⁷
Ordenada Origem						-121,192	
Declive						3721,612 (L/mg)	
Desvio Padrão Residual s_y/x_w						21,384	

O teor dos PC esperado, assim como a incerteza associada à sua preparação já foram apresentados no estudo da estabilidade da curva. Relativamente ao teor estimado este é determinado por interpolação, dos sinais obtidos para os PC na curva ponderada. Quanto à incerteza associada a essa determinação, a única componente que varia é a associada à interpolação pois o desvio padrão associado a x_0 , $s_{x_{0w}}$, varia com a resposta instrumental. Deste modo, esta será a única que será calculada novamente. A tabela 33 apresenta os sinais e os teores dos PC obtidos por interpolação na curva de calibração assim como a incerteza associada à interpolação.

Tabela 33 - Sinais e teores estimados dos padrões de controlo de lítio, com a respectiva incerteza de interpolação, considerando calibrações baseadas em leituras únicas e duplicadas dos padrões de calibração.

1 Replicado	Área	x_0 (mg/L)	$S_{x_{0w}}$	$s_{x_{0w}}/x_0$
PC1	646,6	0,206	0,00272	0,0132
PC2	2913,8	0,802	0,00959	0,0120
2 Replicados	Área	x_0 (mg/L)	$S_{x_{0w}}$	$s_{x_{0w}}/x_0$
PC1	646,6	0,206	0,00413	0,0200
PC2	2913,8	0,816	0,01531	0,0188

Os teores estimado e esperado, e as respectivas incertezas foram comparadas recorrendo à equação 32, que permite avaliar a necessidade de efectuar medições duplicadas dos sinais dos padrões de calibração para a obtenção de estimativas adequadas do teor dos analitos. Os resultados do teste encontram-se na tabela 34.

Tabela 34 - Resultados obtidos para o estudo de compatibilidade dos teores estimados e esperados de padrões de controlo de lítio com base em calibrações obtidas de sinais únicos (1 rep.) e sinais duplicados (2 rep.) dos padrões de calibração.

	Catão	PC	Área	x_0	C_{PCPrep}	$u'x_0$	$u'_{CPCPrep}$	Conclusão
1 Rep.	Lítio	1	646,55	0,206	0,200	0,014	0,007	Compatíveis
		2	2913,8	0,802	0,800	0,012	0,006	Compatíveis
2 Rep.	Lítio	1	646,55	0,206	0,200	0,020	0,007	Compatíveis
		2	2913,8	0,816	0,800	0,019	0,006	Compatíveis

Como se pode ver pelos resultados obtidos, em ambos os casos, os teores estimados e esperados são metrologicamente compatíveis independentemente do número de leituras replicados dos padrões de calibração. No entanto, a incerteza expandida de resultados

baseados em calibrações obtidas através de ensaios únicos é maior porque o factor de expansão (*t-student*) está associada a um menor número de graus de liberdade.

O teor dos PC estimados pelos dois casos foi aceite em todos os analitos em estudo. No entanto, e tendo em conta o impacto do número de leituras replicadas nos factores de expansão da incerteza, optou-se por em rotina serem lidos dois replicados da curva.

3.2.8 Incerteza associada à medição da composição iónica de extractos aquosos de explosivos

Como foi possível ver, a quantificação das espécies através da interpolação numa curva de calibração, envolve várias etapas às quais estão associadas diversas fontes de incerteza que afectam o resultado da medição. Uma correcta interpretação desses resultados implica a sua apresentação com a respectiva incerteza. Para isso, é necessário identificar todas as fontes inerentes ao processo através da análise da sequência de medição. As fontes de incertezas identificadas na caracterização de extractos aquosos de explosivos são: a diluição do extracto da amostra, a interpolação de sinais na curva e a preparação dos padrões de calibração, que varia consoante o tipo de solução mãe usada. No entanto, e no caso das amostras reais, como o objectivo da quantificação é a determinação do balanço iónico, os resultados obtidos serão expressos em mol/L de cargas, pelo que há uma conversão de unidades que tem de ser considerada. Neste caso a incerteza associada à massa molar das espécies é avaliada. Relativamente à análise dos MRC os resultados são expressos directamente em mg/L, não sendo necessário considerar uma conversão de unidades. Neste trabalho, foi usada a abordagem “*bottom-up*” ou “sub-analítica” de quantificação da incerteza da medição. Segue-se o processo da quantificação da incerteza associada ao teor de analito presente em amostras desconhecidas.

Medições baseadas em soluções preparadas por pesagem de sais de analito

Quando a solução mãe é preparada a partir do respectivo sal, ou seja, no caso de todos os catiões e do clorato, o diagrama causa efeito onde estão representadas todas as componentes que afectam o resultado obtido para a análise quantitativa de amostras desconhecidas é o que se apresenta na figura 17.

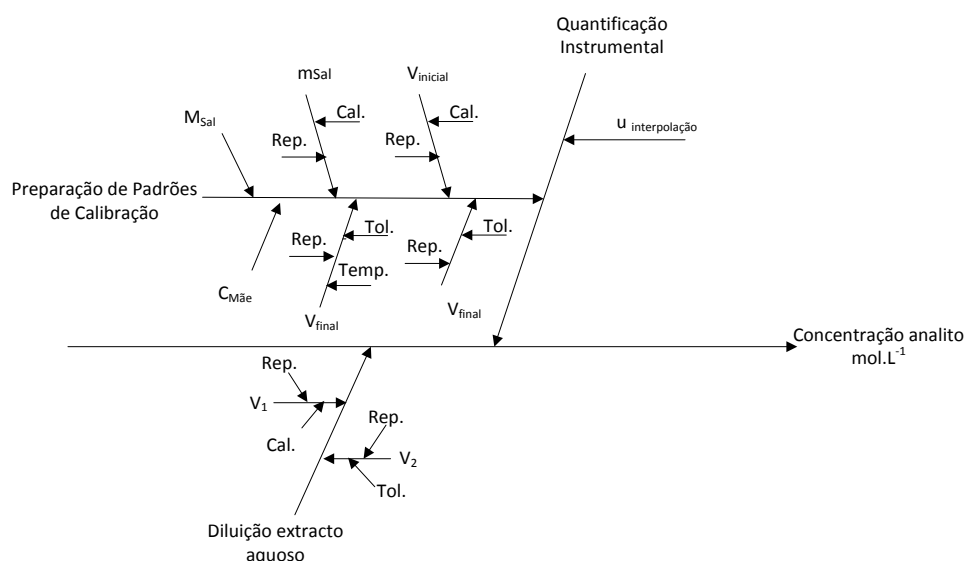


Fig.17 - Diagrama causa efeito no caso em que os padrões da curva são preparados com base nas soluções mãe preparadas a partir dos respectivos sais.

Como se pode ver pelo diagrama anterior, a incerteza associada à quantificação instrumental é função da incerteza associada à interpolação do sinal da amostra, da associada à preparação dos padrões da curva. Quando é feita uma diluição do extracto aquoso, esta também tem de ser contabilizada. De seguida, é apresentada a quantificação de cada componente.

1) Incerteza associada à diluição do extracto aquoso

Como foi referido no capítulo 2, a diluição das amostras é feita por adição de um volume de amostra V_1 a um volume de “água”/ “solução ácida” V_2 , à qual está associada um factor de diluição $F_{v1:2} = \frac{V_1}{(V_1+V_2)}$. A incerteza associada a essa diluição vai ser determinada pela equação 33. (Silva, 2004)

$$u_{v1:2} = \sqrt{\left(\frac{V_2}{(V_1+V_2)^2}\right)^2 u_{V1}^2 + \left(\frac{V_1}{(V_1+V_2)^2}\right)^2 u_{V2}^2} \quad (33)$$

Para o cálculo de u_V é aplicada a equação do cálculo da incerteza associada a uma medição de volume (equação 34) que considera as componentes de calibração e repetibilidade do material volumétrico. A incerteza associada à calibração do material volumétrico, (u_V^{cal}) , é estimada através da tolerância do seu valor nominal e considerando uma distribuição triangular. A incerteza padrão da repetibilidade, (u_V^{rep}) , da manipulação do

material volumétrico é estimada pelo desvio padrão associado a um conjunto de medições sucessivas de volume obtidas em condições de repetibilidade e estudadas gravimetricamente.

As três componentes são combinadas pela equação 34 que permite o cálculo da incerteza padrão associada a V_1 e V_2 . (IPAC, 2007)

$$u_V = \sqrt{(u_V^{cal})^2 + (u_V^{rep})^2} \quad (34)$$

2) Incerteza associada à quantificação instrumental

PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO

As fontes de incerteza associadas à preparação dos padrões de calibração serão a pureza do sal, a massa molar do mesmo, a pesagem do sólido, a medição do volume da solução mãe e, em alguns dos casos, a diluição da solução mãe para a solução mãe diluída, a partir da qual são preparados os padrões.

Pureza do Sal

Quando se efectuam pesagens de sólidos, no caso deste trabalho, sais, é necessário considerar a pureza destes. A incerteza associada à pureza é independente da incerteza associada à pesagem, mas torna-se importante para definir qual a quantidade de substância que foi pesada. Esta é calculada considerando uma distribuição rectangular e o seu desvio em relação a uma pureza de 100% (equação 35). (Silva, 2004)

$$u'_{Pureza} = \frac{\left(\frac{(100 - Pureza)}{2} \right)}{\left(\frac{(100 + Pureza)}{2} \right)} \quad (35)$$

Em que u'_{Pureza} é a incerteza padrão relativa associada à pureza.

Pesagem do Sal

A incerteza associada à pesagem do sal usado para a preparação da solução mãe (u_m) é dada pela equação 36, que permite a quantificação da incerteza associada a pesagens por diferença, onde $m = (\text{massa bruta}) - (\text{massa da tara})$. Esta combina a componente da calibração da balança, (u_{bal}^{cal}), que representa a incerteza associada à

linearidade da balança estimada com base no erro máximo admissível desta e considerando uma distribuição rectangular, e a componente da repetibilidade da pesagem, (u_{bal}^{rep}), estimada pelo desvio padrão associado a um conjunto de pesagens replicadas de uma determinada massa obtidas em condições de repetibilidade. (IPAC, 2007)

$$u_m = \sqrt{2(u_{bal}^{cal})^2 + 2(u_{bal}^{rep})^2} \quad (36)$$

Como se pode ver pela equação anterior as incertezas referidas anteriormente são contabilizadas duas vezes devido ao facto das duas pesagens, massa bruta e massa da tara, serem independentes.

Massa Molar do Sal

A incerteza associada à Massa Molar do sal (u_{MSal}) é calculada com base nas incertezas padrão associadas às massas atómicas de cada um dos elementos que constituem o sal. Segue-se como exemplo a equação que permite o cálculo da incerteza padrão associada à massa molar do nitrato de cálcio $u_{M_{Ca(NO_3)_2}}$. (Silva, 2004; Wieser, 2009)

$$u_{M_{Ca(NO_3)_2}} = \sqrt{u^2(Ca) + 2^2 \cdot u^2(N) + 6^2 \cdot u^2(O)} \quad (37)$$

Em que u_j representa a incerteza padrão associada à massa atómica do elemento j .

Na tabela 35 são apresentados os resultados obtidos para as fontes de incerteza referidas para os diversos iões em que as soluções mãe são preparadas a partir dos sais puros.

Tabela 35 - Incertezas padrão relativas associadas à pureza do Sal, à sua massa molar e à pesagem.

Ião	Sal	Pureza (%)	u'_{pureza}	m_{pesada} (g)	u'_m	M_{sal} (g/mol)	u'_{MSal}
ClO_3^-	$NaClO_3$	99	$2,9 \times 10^{-3}$	0,128	0,032	106,44	$3,0 \times 10^{-5}$
Li^+	$LiNO_3$	99,99	$2,9 \times 10^{-5}$	0,993	0,004	68,94	$2,5 \times 10^{-4}$
Na^+	$NaNO_3$	99,5	$1,4 \times 10^{-3}$	0,185	0,023	84,99	$9,0 \times 10^{-6}$
NH_4^+	$CINH_4$	99-100,5	$4,3 \times 10^{-3}$	0,297	0,014	53,49	$5,0 \times 10^{-5}$
K^+	KNO_3	99,995	$1,4 \times 10^{-5}$	0,259	0,016	101,11	$6,9 \times 10^{-6}$
Ca^{2+}	$(Ca(NO_3)_2 \cdot H_2O)$	99	$2,9 \times 10^{-3}$	0,454	0,009	182,09	$2,4 \times 10^{-5}$
Mg^{2+}	$(Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$	99,995	$1,4 \times 10^{-5}$	1,054	0,004	256,20	$1,1 \times 10^{-5}$
Sr^{2+}	$(Sr(NO_3)_2)$	99,99	$2,9 \times 10^{-5}$	0,121	0,034	211,63	$3,4 \times 10^{-5}$
Ba^{2+}	$(Ba(NO_3)_2)$	99,999	$2,9 \times 10^{-6}$	0,191	0,022	261,34	$2,7 \times 10^{-5}$

Volume

Para quantificar a incerteza associada à medição do volume de solução mãe (100 mL) é usada a equação 34, à qual é adicionada uma componente relativa ao impacto de desvios da temperatura da solução à temperatura de referência do material volumétrico, u_V^{Temp} , determinada pela equação (38).

$$u_V^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times E}{1,96} \quad (38)$$

Onde V é o volume medido, ΔT é a variação de temperatura considerada e E é o coeficiente de expansão térmica do solvente à temperatura de referência (normalmente 20°C). Quando a T varia apenas alguns graus Celsius acima ou abaixo do valor de referência, o efeito desta pode ser desprezado. (IPAC, 2007)

Como se pode ver pelo esquema de preparação dos padrões apresentado no capítulo 2, todas as soluções mãe feitas a partir dos sólidos puros foram preparadas em balões de 100 mL, pelo que a incerteza associada ao volume apresentada na tabela 36 é aplicada a todos os casos. As componentes de calibração e repetibilidade do balão de 100 mL necessárias à aplicação da equação 34 são apresentadas em anexo.

Tabela 36 – Incerteza padrão relativa associada ao volume da solução padrão mãe

$V_{\text{solução}} \text{ (mL)}$	u'_v
100	0,0006

Diluição da Solução Mãe para a Solução Mãe Diluída

Em alguns casos houve necessidade de recorrer a uma solução mãe diluída para a preparação dos padrões da curva. Quando isso acontece, esta componente tem de ser contabilizada. Considerando a diluição de um volume inicial, V_i , para um volume final, V_f , a incerteza u_{F_v} associada a um factor de diluição $F_v = \frac{V_i}{V_f}$ é calculada pela equação seguinte:

$$\frac{u_{F_v}}{F_v} = \sqrt{\frac{(u_{V_i}^{cal})^2 + (u_{V_i}^{rep})^2}{V_i^2} + \frac{(u_{V_f}^{cal})^2 + (u_{V_f}^{rep})^2}{V_f^2}} \quad (24)$$

Onde $(u_{V_i}^{cal})$ e $(u_{V_i}^{rep})$ correspondem às incertezas padrão associadas à calibração e repetibilidade da pipeta usada para medir V_i da solução mãe e $(u_{V_f}^{cal})$ e $(u_{V_f}^{rep})$ referem-se

ao volume V_f onde a solução mãe diluída foi preparada. As componentes referidas são calculadas como foi descrito anteriormente. (IPAC, 2007)

INTERPOLAÇÃO DO SINAL NA CURVA DE CALIBRAÇÃO

O cálculo da incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração é realizado como foi descrito no ponto 3.2.4, ou seja, através cálculo dos desvios padrão de interpolação não ponderado ou ponderado (equações 11 e 17 respectivamente).

Relativamente ao factor de ponderação associado ao sinal da amostra w_0 , necessário ao cálculo do desvio padrão de interpolação ponderado, este é determinado usando o modelo desenvolvido de variação da precisão do sinal instrumental com a concentração (s vs concentração ou s' vs concentração). Quando é observada uma relação constante entre a concentração e o desvio padrão relativo do sinal este é determinado pela equação 39.

$$w_0 = \frac{1/c_o^2}{\left(\frac{\sum c_i^2}{n}\right)} \quad (39)$$

Onde c_o corresponde à concentração do analito obtida por interpolação; c_i é a concentração dos padrões da curva e n os níveis de concentração estudados na calibração.

Quando por outro lado a relação é linear temos a equação 40.

$$w_0 = \frac{1/(bc_o + a)}{\left(\frac{\sum (bc_i + a)^2}{n}\right)} \quad (40)$$

Em que a e b são, respectivamente, a ordenada na origem e o declive da regressão linear da concentração em função do desvio padrão absoluto da resposta instrumental.

Combinando as várias componentes de incerteza que afectam o resultado, a incerteza padrão final relativa associada ao teor estimado, em mol/L, do extracto aquoso do explosivo é dado pela equação 41.

$$u'_y = \sqrt{(s'_{x0})^2 + (u'_{Pureza})^2 + (u'_m)^2 + (u'_{MSal})^2 + (u'_V)^2 + (u'_{V1:2})^2 + (u'_{F_v})^2} \quad (41)$$

Esta é convertida em incerteza padrão absoluta multiplicado o seu valor pelo teor ao qual ela está associada.

Medições baseadas em soluções padrão comerciais

Nos casos em que os padrões são preparados a partir das soluções mãe comerciais, soluções da Merk com concentração ≈ 1000 mg/L, o diagrama causa efeito que representa todas as fontes que afectam o resultado das amostras é representado na figura 18.

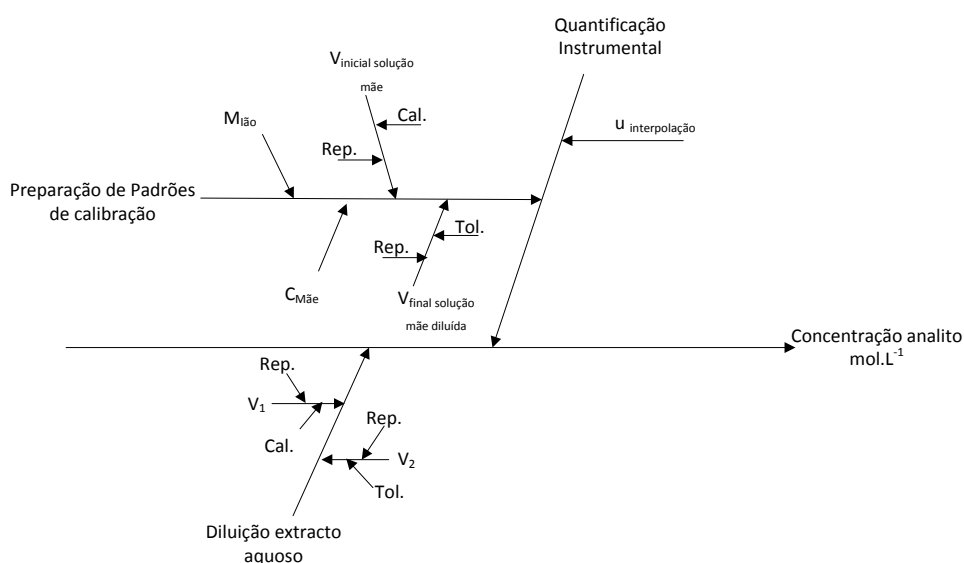


Fig.18 - Diagrama causa efeito no caso em que os padrões da curva são preparados com base em soluções padrão comerciais.

Como se pode ver pelo diagrama de causa efeito, as fontes de incerteza que afectam o resultado obtido da composição do extracto aquoso do explosivo são as mesmas que no caso anterior (Fig.17), variando apenas as componentes associadas à preparação dos padrões. Deste modo, a incerteza associada à diluição da amostra, quando esta é realizada, e a associada à interpolação do sinal na curva de calibração são calculadas pelas expressões referidas para o caso anterior.

PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO

As fontes de incerteza associadas à preparação dos padrões de calibração com base nas soluções mãe comerciais são: a incerteza associada à concentração da solução mãe, a associada à massa molar do ião e, por fim, e apenas quando esta é realizada, a associada à diluição da solução mãe.

A incerteza padrão relativa associada à preparação da solução mãe ($u'_{M\tilde{a}e}$), é determinada a partir da incerteza absoluta expandida dada pelo fabricante. Esta é convertida em incerteza padrão dividindo o seu valor pelo factor de expansão associado, k , que neste caso é 2. Para se obter a incerteza padrão relativa, a última tem de ser dividida pelo valor da concentração da solução. Quanto à incerteza associada à massa molar do ião ($u'_{Mi\tilde{a}o}$), esta é calculada da mesma forma como no caso anterior mas considerando apenas o ião. A incerteza associada às diluições da solução mãe para as soluções mãe diluídas (u'_{Fv}), é calculada da mesma forma como no caso anterior (equação 24).

As componentes de incertezas associadas à preparação dos padrões da curva para cada ião, são apresentadas na tabela seguinte:

Tabela 37 - Incertezas padrão relativas associadas à concentração da solução mãe, à diluição desta e à massa molar do ião.

	Dados Solução Mãe			Solução Mãe Diluída				Ião	
	C (mg/L)	$U_{M\tilde{a}e}$	$u'_{M\tilde{a}e}$	C (mg/L)	V_i	V_f	u'_{Fdil}	$M_{i\tilde{a}o}$ (g/mol)	$u'_{Mi\tilde{a}o}$
F ⁻	1002	2	$9,98 \times 10^{-4}$	500	25	50	$1,34 \times 10^{-3}$	18,99	$2,63 \times 10^{-8}$
Cl ⁻	999	2	$1,00 \times 10^{-3}$	500	25	50	$1,34 \times 10^{-3}$	35,45	$8,95 \times 10^{-5}$
NO ₂ ⁻	1003	5	$2,49 \times 10^{-3}$	500	25	50	$1,34 \times 10^{-3}$	46,00	$1,07 \times 10^{-5}$
Br ⁻	1000	2	$1,00 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	79,90	$1,25 \times 10^{-5}$
NO ₃ ⁻	1001	5	$2,50 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	62,00	$1,11 \times 10^{-5}$
SO ₄ ²⁻	1004	2	$9,96 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	96,05	$5,19 \times 10^{-5}$

Combinando as várias componentes, a incerteza padrão relativa final associada ao resultado da nossa amostra é, neste caso, dada pela equação 42.

$$u'_y = \sqrt{(s'_{x0})^2 + (u'_{M\tilde{a}e})^2 + (u'_{Fv})^2 + (u'_{Mi\tilde{a}o})^2 + (u'_{V1:2})^2} \quad (42)$$

3.3 Análise de Materiais de Referência Certificados

Para testar a resposta dos modelos desenvolvidos e validados foram analisados materiais de referências certificados com teor conhecido, expresso em mg/L. A composição dos MRC está descrita no capítulo 2, onde podemos ver que a concentração esperada para cada um dos aniões e dos catiões é de 10 mg/kg \pm 0,2%, com $k = 2$. Deste modo, associada à concentração esperada de cada espécie teremos uma incerteza padrão absoluta, $u_{MRCEsperada}$, de 0,01 mg/kg. Tendo em conta que os resultados da análise deste MRC são expressos em mg/L, este valor de referência deve ser convertido nestas unidades através da multiplicação por uma densidade de água igual a 1 g/L, afectada pelo impacto da temperatura na adequação deste valor num intervalo de temperatura de 15-25°C. Neste caso, a incerteza padrão relativa associada à conversão de unidades é 0,17%, conduzindo a concentrações dos iões no MRC de 10 mg/L associadas a uma incerteza padrão de 0,02 mg/L.

A análise dos MRC foi realizada pelo mesmo esquema que foi usado para a análise quantitativa das amostras (fig. 19). A determinação do teor das espécies presentes no MRC baseou-se na interpolação do seu sinal instrumental na curva de calibração diária expressa em mg/L. A incerteza associada a essa determinação foi calculada segundo o processo referido anteriormente no ponto 3.2.8, referente ao cálculo das incertezas. No entanto, e tendo em conta que os resultados são expressos em mg/L, nos casos em que as soluções mãe são preparadas a partir dos sais, é necessário contabilizar incerteza associada à massa molar do ião.

As tabelas 38 e 39 apresentam os resultados obtidos na análise do MRC dos aniões e catiões, respectivamente.

Tabela 38 - Resultados da determinação do teor de aniões no MRC e respectiva incerteza padrão.

Anião	Conc. (mg/L)	$u_{MRCEstimada}$ (mg/L)
Fluoreto	9,7	1,4
Cloreto	11,10	0,17
Brometo	10,25	0,16
Nitrato	9,42	0,26
Sulfato	11,3	1,2

Tabela 39 - Resultados da determinação do teor de cátions no MRC e respectiva incerteza padrão.

Catão	Conc. (mg/L)	$u_{MRCEstimada}$ (mg/L)
Lítio	10,87	0,49
Sódio	8,39	0,59
Magnésio	10,040	0,002
Potássio	10,07	0,33
Cálcio	9,64	0,20

A avaliação dos resultados obtidos é feita através de um teste de compatibilidade (equação 43) tendo em conta a concentração e a incerteza estimada e a fornecida pelo fabricante.

$$|C_{MRCEstimada} - C_{MRCEesperada}| \leq t(99; n - 2) \times \sqrt{(u_{MRCEstimada})^2 + (u_{MRCEesperada})^2} \quad (43)$$

Onde $C_{MRCEstimada}$ é a concentração da espécie estimada, $C_{MRCEesperada}$ a concentração esperada, $u_{MRCEstimada}$ e $u_{MRCEesperada}$ as incertezas padrão associadas a esses teores, respectivamente, e n é o número de réplicas usadas na regressão linear.

O teste de compatibilidade foi aplicado aos vários iões e em todos os teores estimados são compatíveis com os esperados, pelo que se demonstra que o procedimento de medição, incluindo o cálculo da incerteza, é adequado à caracterização da composição iónica de soluções aquosas.

3.4 Controlo da Qualidade

Depois de validados os métodos de análise desenvolvidos, e confirmada a qualidade da sua resposta pela análise de MRC, em análises de rotina, é necessário verificar se os métodos continuam a responder de forma adequada de modo a garantir a qualidade dos resultados obtidos. Para isso, são definidas ferramentas e critérios de controlo da qualidade da resposta do método, que permitem obter informação sobre o funcionamento do método a determinada altura. Esses critérios definem intervalos de aceitação e, em rotina, um determinado conteúdo será aceite se respeitar o critério, ou seja, se produzir uma resposta dentro do intervalo definido para o mesmo. Tendo em conta que a análise será feita em dois passos, foram desenvolvidos critérios de aceitação tanto para a identificação como para a quantificação dos analitos. Assim, inicialmente foram definidos critérios de controlo da

qualidade para a análise qualitativa baseados no t_r dos analitos. Quanto ao controlo da qualidade dos resultados quantitativos, este será realizado pela avaliação do teor de um PC, estimado pela curva diária e pela avaliação do balanço iónico de aniões e catiões.

3.4.1 Análise qualitativa

O esquema proposto para a análise qualitativa de amostras desconhecidas é apresentado na figura 19 e consiste na leitura de amostras entre dois PC preparados no dia da sua leitura.

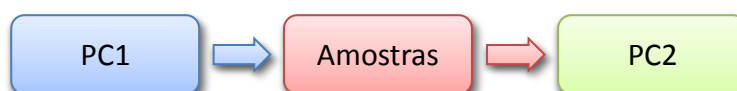


Fig.19 – Esquema proposto para a análise qualitativa de amostras desconhecidas.

Para avaliar a resposta do método, inicialmente é testada a concordância entre os t_r obtidos nos dois PC pela aplicação do critério que se segue (equação 44). Este é definido com base nos limites de repetibilidade obtidos durante o processo de validação do desempenho qualitativo. Os replicados são aceites se a sua diferença for menor que esse limite.

$$|t_{r1} - t_{r2}| \leq 2,8 \cdot s_{rep} \quad (44)$$

Quando o critério anterior é aceite, prova-se que a instrumentação está a funcionar em devidas condições.

Depois de comprovar que o método está a responder correctamente, segue-se a avaliação do t_r dos picos da amostra, através da aplicação do mesmo critério considerado atrás, considerando t_{r1} correspondente ao PC1 (expressão 45).

$$|t_{rAmostra} - t_{r1}| \leq 2,8 \cdot s_{rep} \quad (45)$$

Se o critério for aceite, considera-se que existem indicações da presença de analito na amostra.

A identidade dos catiões é confirmada pela análise quantitativa, onde é usada a mesma coluna mas condições cromatográficas diferentes das usadas no método qualitativo. No caso dos aniões, a utilização de uma coluna diferente permite a confirmação das espécies aniónicas presentes no extracto aquoso do explosivo.

3.4.2 Análise quantitativa

O esquema proposto para esta análise foi definido tendo em conta os resultados obtidos durante a validação do desempenho quantitativo do procedimento de medição, e consiste na leitura de amostras e de um PC entre dois replicados de uma curva de calibração diária.



Fig.20 - Esquema proposto para a análise quantitativa de amostras desconhecidas.

Antes de se partir para a quantificação dos analitos presentes nas amostras desconhecidas, a resposta da curva de calibração lida no dia é testada num estudo de compatibilidade metrológico. Este é idêntico aos realizados anteriormente, ou seja, é baseado no teor estimado e esperado de um PC e nas respectivas incertezas. Desse modo, o sinal instrumental obtido para o PC é interpolado na curva construída com base nos dois replicados diários, e a sua aceitação é verificada através do teste definido anteriormente (equação 32). Quando o critério é aceite, os teores estimados e esperados do PC são compatíveis, o que indica que a curva está a responder de forma adequada e estamos em condições de determinar o teor do analito na amostra.

Depois de quantificados todos os analitos presentes em solução, é determinado o seu balanço iónico que permite a identificação dos compostos constituintes da amostra desconhecida. Este balanço é realizado tendo em conta a incerteza das diversas determinações. Deste modo, os analitos identificados são combinados na forma de sais e esse balanço é testado por um estudo de compatibilidade metrológica semelhante ao definido anteriormente. Neste caso é avaliada a compatibilidade das concentrações molares de cargas positivas (C_P) e negativas (C_N) do extracto aquoso. (equação 46)

Este é feito entre a concentração de aniões (C_A) e catiões (C_C) totais no extracto aquoso, expressas em molaridade, e tendo em conta as cargas eléctricas dos iões (equação 46).

$$|C_P - C_N| \leq \sqrt{u_P^2 + u_N^2} \quad (46)$$

Onde u_P e u_N são as incertezas padrão associadas às concentrações molares de cargas positivas e negativas, respectivamente.

3.5 Análise de Amostras Reais

A análise de amostras reais teve como objectivo testar a resposta dos procedimentos de medição assim como os critérios de controlo da qualidade desenvolvidos para a análise em rotina. O esquema geral de análise proposto, tendo por base os resultados obtidos durante a validação e os critérios de controlo da qualidade desenvolvidos, encontra-se na figura 21.

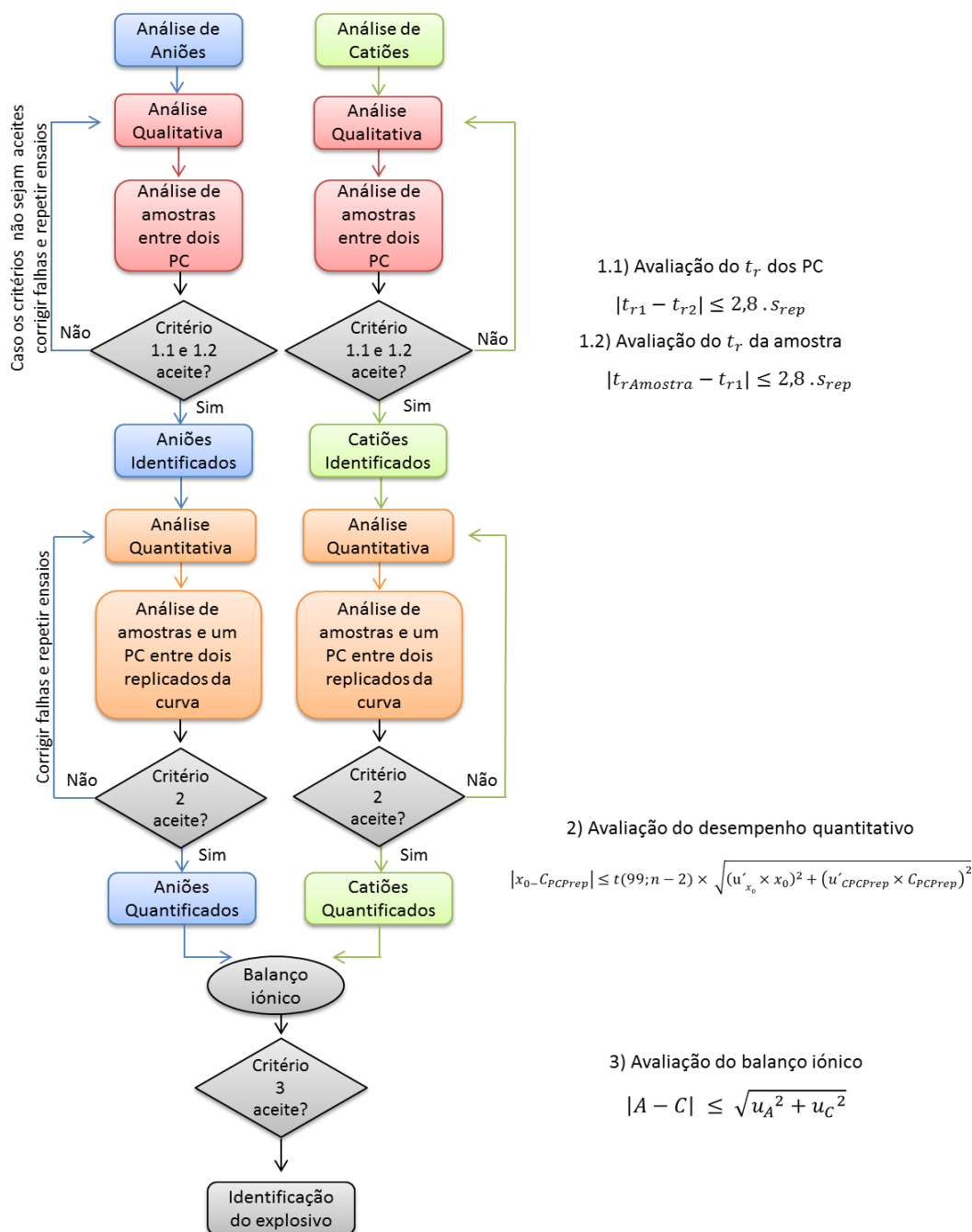


Fig.21 – Esquema proposto para a análise de amostras desconhecidas em rotina.

Como se pode ver pelo esquema anterior, depois de preparada a amostra esta é analisada por cromatografia iónica. Inicialmente é feita uma análise qualitativa da presença de aniões e catiões onde é possível revelar a identidade dos analitos que estão presentes na solução aquosa. O controlo da qualidade começa já neste primeiro passo da análise, onde serão testados os critérios 1.1 e 1.2 (dados pelas equações 44 e 45, respectivamente). No primeiro caso é avaliada a funcionalidade do método através do teste à concordância dos t_r dos PC, e, se este se verificar segue-se então para o 1.2 onde um resultado positivo permite a identificação do analito em causa. No caso da identificação dos aniões, os picos correspondentes ao clorato e ao brometo estão co-eluídos pelo que quando este pico é detectado a identidade do analito só será conhecida na análise qualitativa. Depois de identificados os analitos presentes na amostra, segue-se a análise quantitativa, feita através da leitura de dois replicados de uma curva diária que possibilita a determinação dos teores dos analitos identificados. Antes de se proceder à quantificação é testada a resposta da curva pela aplicação do critério 2 (equação 32), onde é avaliado o teor do PC estimado. Quando o critério é aceite, segue-se então a quantificação dos analitos presentes nas amostras. Relativamente à quantificação dos aniões há que ter em conta a instabilidade dos padrões de fluoreto pelo que, quando for necessário fazer a sua quantificação tem de ser preparada uma série nova de padrões. O último passo da análise é a avaliação do balanço dos iões em solução que permite conhecer quais os sais que constituem a amostra e consequentemente identificar qual o tipo de explosivo usado. Este balanço é baseado na aplicação do critério 3 (dado pela equação 46), que permite avaliar a combinação dos iões e desse modo conhecer a composição da amostra. Os critérios 1.1, 1.2, 2 e 3 são descritos em pormenor no ponto 3.4 referente ao controlo da qualidade.

3.5.1 Análise qualitativa

As amostras reais em estudo, descritas no capítulo 2, foram sujeitas a uma análise qualitativa aniónica e catiónica. Os t_r obtidos para os analitos presentes nas amostras e os t_r obtidos para o PC1 lido no dia da análise são apresentados nas tabelas 40 e 41, para os aniões e catiões, respectivamente. Os resultados da aplicação do critério de identificação do analito (equação 45) a esses dados e a identidade do ião em causa também são apresentados nas tabelas que se seguem.

Tabela 40 – Tempo de retenção de aniões identificados nas amostras e critério de identificação dos analitos.

Amostra	Anião	t_{rPC1}	$t_{ramostra}$	Critério Aceitação	Decisão
1	Nitrato	6,20	6,22	$(6,22-6,20) \leq 0,104$	Aceite
2	Brometo/Clorato	5,37	5,48	$(5,48-5,37) \leq 0,155$	Aceite
2	Sulfato	9,67	9,67	$(9,70-9,67) \leq 0,225$	Aceite
3	Nitrato	6,20	6,12	$(6,12-6,20) \leq 0,104$	Aceite
4	Nitrato	6,21	6,25	$(6,25-6,21) \leq 0,104$	Aceite
5	Nitrato	6,20	6,19	$(6,19-6,20) \leq 0,104$	Aceite
6	Nitrato	6,21	6,16	$(6,16-6,21) \leq 0,104$	Aceite

Tabela 41 - Tempo de retenção de catiões identificados nas amostras e critério de identificação dos analitos.

Amostra	Catião	t_{rPC1}	$t_{ramostra}$	Critério Aceitação	Decisão
1	Amónio	3,97	4,05	$(4,05-3,97) \leq 0,093$	Aceite
1	Cálcio	7,80	8,11	$(8,11-7,80) \leq 0,328$	Aceite
2	Sódio	3,65	3,73	$(3,73-3,65) \leq 0,092$	Aceite
2	Potássio	4,79	4,77	$(4,77-4,79) \leq 0,099$	Aceite
3	Potássio	4,79	4,76	$(4,76-4,79) \leq 0,099$	Aceite
4	Amónio	3,97	4,02	$(4,02-3,97) \leq 0,093$	Aceite
5	Potássio	4,79	4,76	$(4,76-4,79) \leq 0,099$	Aceite
6	Potássio	4,80	4,75	$(4,75-4,80) \leq 0,099$	Aceite

Há que realçar que antes da aplicação do critério anterior, em todos casos foi verificada a concordância dos t_r obtidos nos dois PC através da aplicação da equação 44, comprovando-se a funcionalidade do método.

Como se pode ver pelas tabelas 40 e 41 foi possível revelar a identidade dos diversos analitos presentes nas amostras, excepto na amostra 2 onde o pico detectado na análise aniónica corresponde à sobreposição do brometo e do clorato. Neste caso, a confirmação do analito em causa será feita na análise quantitativa.

3.5.2 Análise quantitativa – balanço iónico

Foi realizada a análise quantitativa das mesmas amostras que permitiu não só a confirmação dos analitos identificados na análise qualitativa como também a quantificação dos mesmos por interpolação.

Como já foi referido anteriormente, o objectivo da quantificação dos analitos presentes nas amostras é a determinação do balanço iónico. Este é feito por comparação da

soma das moles de carga positivas e negativas, provenientes dos cátions e aniões respectivamente. Deste modo, as concentrações serão determinadas por interpolação dos sinais instrumentais em curvas expressas em mol/L. A conversão das concentrações das gamas de trabalho de mg/L para mol/L foram feitas aplicando a equação 47 aos padrões que são preparados a partir dos sólidos puros, e a equação 48 quando se tratam de padrões preparados a partir das soluções comerciais.

$$C \text{ (mol/L)} = \frac{m(g) \times \text{Pureza do Sal}}{M_{\text{Sal}}(g/mol) \times V(L)} \quad (47)$$

$$C \text{ (mol/L)} = \frac{C \text{ (mg/L)} \times V_i}{M_{\text{ião}}(g/mol) \times V_f} \quad (48)$$

Para tornar clara a determinação do teor dos analitos presentes em amostras desconhecidas, segue-se como exemplo o caso da amostra 1. A análise qualitativa revelou a presença Nitrato, Amónio e Cálcio, que foi posteriormente confirmada pela análise quantitativa da amostra. Segue-se então o cálculo da concentração do nitrato assim como da incerteza que lhe está associada.

Como foi visto na validação do desempenho quantitativo do método, a resposta instrumental deste anião é descrita pelo modelo de regressão ponderado. Pelos dados da tabela 29, é possível verificar que existe uma relação linear entre o desvio padrão absoluto da resposta instrumental e a concentração do analito, pelo que o factor de ponderação, w_i , associado a cada x_i , é dado pela equação 31.

A tabela 42 apresenta os resultados obtidos para os dois replicados da curva diária, o cálculo dos factores de ponderação w_i e todos os cálculos intermédios necessário à determinação dos parâmetros de regressão ponderados da curva.

Tabela 42 – Resultados obtidos na leitura da curva diária, factores de ponderação associados a cada x_i e cálculos intermédios necessários à determinação dos parâmetros da curva ponderada.

x_i (mol/L)	y_i	W_i	Wix_i (mol/L)	Wiy_i	$Wixiy_i$ (mol/L)	Wix_i^2 (mol/L) ²	Wiy_i^2
$3,23 \times 10^{-5}$	575,831	0,999	$3,23 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^2$	0,019	$1,04 \times 10^{-9}$	$3,31 \times 10^5$
$6,46 \times 10^{-5}$	1181,012	1,000	$6,46 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^3$	0,076	$4,17 \times 10^{-9}$	$1,39 \times 10^6$
$9,69 \times 10^{-5}$	1849,803	1,000	$9,69 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^3$	0,179	$9,39 \times 10^{-9}$	$3,42 \times 10^6$
$1,29 \times 10^{-4}$	2486,409	1,001	$1,29 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^3$	0,321	$1,67 \times 10^{-8}$	$6,19 \times 10^6$
$3,23 \times 10^{-5}$	625,476	0,999	$3,23 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^2$	0,020	$1,04 \times 10^{-9}$	$3,91 \times 10^5$
$6,46 \times 10^{-5}$	1215,713	1,000	$6,46 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^3$	0,079	$4,17 \times 10^{-9}$	$1,48 \times 10^6$
$9,69 \times 10^{-5}$	1834,568	1,000	$9,69 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^3$	0,178	$9,39 \times 10^{-9}$	$3,37 \times 10^6$
$1,29 \times 10^{-4}$	2600,420	1,001	$1,29 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^3$	0,336	$1,67 \times 10^{-8}$	$6,77 \times 10^6$
Soma		8,000	$6,46 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^4$	1,208	$6,26 \times 10^{-8}$	$2,33 \times 10^7$

Aplicando as equações 13 e 14, o declive e a ordenada na origem ponderados vão ser dados respectivamente por:

$$b_w = \frac{1,208 - (8 \times (6,46 \times 10^{-4}) \times (1,2 \times 10^4))}{((6,26 \times 10^{-8}) - (8 \times ((6,46 \times 10^{-4})^2)))} \quad \text{e} \quad a_w = (1,2 \times 10^{-4}) - b_w \cdot 6,46 \times 10^{-4}$$

Os resultados dos parâmetros ponderados assim como o sinal obtido no cromatograma da amostra e a respectiva concentração determinada por interpolação são apresentados na tabela 43.

Tabela 43 – Parâmetros de regressão ponderados da curva diária, sinal instrumental obtido para a amostra e a concentração estimada por interpolação desse mesmo sinal na curva determinada.

Parâmetro Ponderado	Sinal Amostra	Conc. (mol/L)
Declive (L/mg)	20036013,775	
Ordenada	-71,896	7,48×10 ⁻⁵

Considerando a diluição que foi feita à amostra, neste caso de 25 µL + 10 mL, associada a um factor de diluição $F_v = \frac{0,025}{10+0,025} = 0,0025$, o teor de nitrato na amostra original será:

$$C_{\text{Nitrato}} = \frac{7,48 \times 10^{-5}}{0,0025} = 0,02998 \text{ mol/L.}$$

Segue-se o cálculo a incerteza associada a esta determinação. A diluição referida foi realizada usando uma micropipeta de 20-200 µL para a medição do volume de amostra e uma pipeta graduada de 20 mL para a medição do volume de água. Os valores da repetibilidade e calibração das pipetas referidas estão apresentados em anexo.

O cálculo da incerteza associada à diluição da amostra é feito através da equação 33. Assim, aplicando os valores obtém-se:

$$u_{V1:2} = \sqrt{\left(\frac{10}{(0,025+10)^2}\right)^2 \cdot (\sqrt{(0,01106)^2 + (0,00048)^2})^2 + \left(\frac{0,025}{(0,025+10)^2}\right)^2 \cdot (\sqrt{(0,03127)^2 + (0,0244)^2})^2} = 5,056 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

Relativamente à incerteza associada à interpolação do sinal instrumental, esta é dada pelo desvio padrão ponderado calculado pela aplicação da equação 17. Para isso é necessário calcular o desvio padrão residual ponderado, $S_{(y/x)w}$, (equação 18) e o factor de ponderação associado à amostra, w_0 , (equação 40).

Aplicando a equação 18, obtemos:

$$S_{(y/x)w} = \left[\frac{(2,33 \times 10^7 - 8 \times (1,2 \times 10^4) - (20036013,775 \times ((6,26 \times 10^{-8}) - (8 \times 6,46 \times 10^{-4}))))}{8 - 2} \right] = 48,00$$

Relativamente ao factor de ponderação w_0 , aplicando a expressão 40 obtém-se um $w_0 = 1,00$

Assim, a incerteza associada à interpolação vai ser:

$$S_{x_{ow}} = \frac{48,00}{20036013,77} \left\{ \frac{1}{1,00} + \frac{1}{8} + \frac{(1425,89 - (1,2 \times 10^4))^2}{(20036013,77)^2 \cdot ((6,26 \times 10^{-8}) - (8 \times (6,46 \times 10^{-4})^2))} \right\}^{1/2} = 2,54 \times 10^{-6} \text{ mg/L}$$

Quanto à incerteza associada à preparação dos padrões, não tendo sido necessário recorrer a uma solução mãe diluída, teremos apenas a componente da preparação da solução mãe e da massa molar do ião. Essas componentes já foram calculadas anteriormente e são apresentadas na tabela 35.

Assim, combinando as diversas fontes na forma de incertezas padrão relativas calculamos a incerteza padrão relativa associada ao teor de nitrato no extracto aquoso original:

$$u'_x = \sqrt{\left(\frac{S_{xo}}{x_o}\right)^2 + (u'_{Mãe})^2 + (u'_{Mião})^2 + \left(\frac{u_{V1:2}}{F_{v1:2}}\right)^2} \Leftrightarrow$$

$$u'_x = \sqrt{\left(\frac{2,54 \times 10^{-6}}{7,48 \times 10^{-5}}\right)^2 + (2,50 \times 10^{-3})^2 + (1,11 \times 10^{-5})^2 + \left(\frac{2,55 \times 10^{-9}}{0,0025}\right)^2} = 3,97 \times 10^{-2}$$

Que corresponde a um incerteza padrão absoluta de:

$$u_x = (3,97 \times 10^{-2}) \times 0,02998 = 0,0012$$

Todas as outras quantificações assim como os cálculos das respectivas incertezas foram realizados de forma semelhante à exemplificada.

Tal como aconteceu com a análise qualitativa, também neste caso antes de se proceder à determinação dos teores dos diversos analitos foi aplicado o critério 2 (dado pela

equação 32), que permitiu testar a resposta das curvas de calibração e a qualidade dos resultados obtidos por elas. O critério foi aceite em todos iões identificados.

A tabela 44 apresenta os resultados quantitativos obtidos para as amostras em estudo.

Tabela 44 - Resultados obtidos na análise quantitativa das amostras e a incerteza padrão associada à medição.

	<i>Anião</i>	Conc. (mol/L)	<i>u</i> (mol/L)	<i>Catião</i>	Conc. (mol/L)	<i>u</i> (mol/L)
Amostra 1	<i>Nitrato</i>	0,0300	0,0012	<i>Amónio</i>	0,0248	0,0007
				<i>Cálcio</i>	0,00189	0,00003
Amostra 2	<i>Clorato</i>	0,0082	0,0006	<i>Potássio</i>	0,0088	0,0003
	<i>Sulfato</i>	0,000047	0,000005	<i>Sódio</i>	0,00036	0,00002
Amostra 3	<i>Nitrato</i>	0,0314	0,0013	<i>Potássio</i>	0,0276	0,0015
Amostra 4	<i>Nitrato</i>	0,0552	0,0025	<i>Amónio</i>	0,0470	0,0015
Amostra 5	<i>Nitrato</i>	0,0452	0,0025	<i>Potássio</i>	0,0411	0,0017
Amostra 6	<i>Nitrato</i>	0,1699	0,0076	<i>Potássio</i>	0,1377	0,0232

A identidade dos analitos identificados na análise qualitativa foi confirmada neste segundo passo da análise onde são usadas outras condições cromatográficas. Relativamente à amostra 2, esta análise permitiu revelar que o pico co-eluido obtido anteriormente se trata do clorato.

Para uma melhor percepção dos resultados, estes foram convertidos em percentagens de moles de cargas dos iões e serão apresentados com a respectiva incerteza. Vejamos como exemplo a equação que permite o cálculo da incerteza associada à percentagem de nitrato presente na amostra 1. (equação 51)

$$y = \%NO_3 = \frac{(mol\ NO_3^-)}{(2 \times mol\ Ca^{2+}) + (mol\ NH_4^+) + (mol\ NO_3^-)} \Leftrightarrow y = \frac{a}{a+b+c} \quad (50)$$

$$u_y = \sqrt{\frac{(b+c)}{(a+b+c)^2} \times u_a^2 + \frac{(-a)}{(a+b+c)^2} \times u_b^2 + \frac{(-a)}{(a+b+c)^2} \times u_c^2} \quad (51)$$

A tabela 45 apresenta dos resultados obtidos.

Tabela 45 - Percentagens de moles de cargas associadas a cada analito presente nas amostras em estudo, acompanhadas pela respectiva incerteza padrão.

	Anião	%	u%	Catião	%	u%
Amostra 1	<i>Nitrato</i>	51,21	1,23	<i>Amónio</i>	42,34	1,18
				<i>Cálcio</i>	6,45	0,05
Amostra 2	<i>Clorato</i>	47,21	2,11	<i>Potássio</i>	50,22	2,05
	<i>Sulfato</i>	0,53	0,01	<i>Sódio</i>	2,05	0,15
Amostra 3	<i>Nitrato</i>	53,22	1,68	<i>Potássio</i>	46,78	1,68
Amostra 4	<i>Nitrato</i>	53,99	1,36	<i>Amónio</i>	46,01	1,36
Amostra 5	<i>Nitrato</i>	52,37	1,69	<i>Potássio</i>	47,63	1,69
Amostra 6	<i>Nitrato</i>	55,24	4,32	<i>Potássio</i>	44,76	4,32

Para uma fácil interpretação dos dados anteriores, estes são representados graficamente na figura 22, onde é possível identificar os constituintes maioritários de cada uma das amostras em estudo.

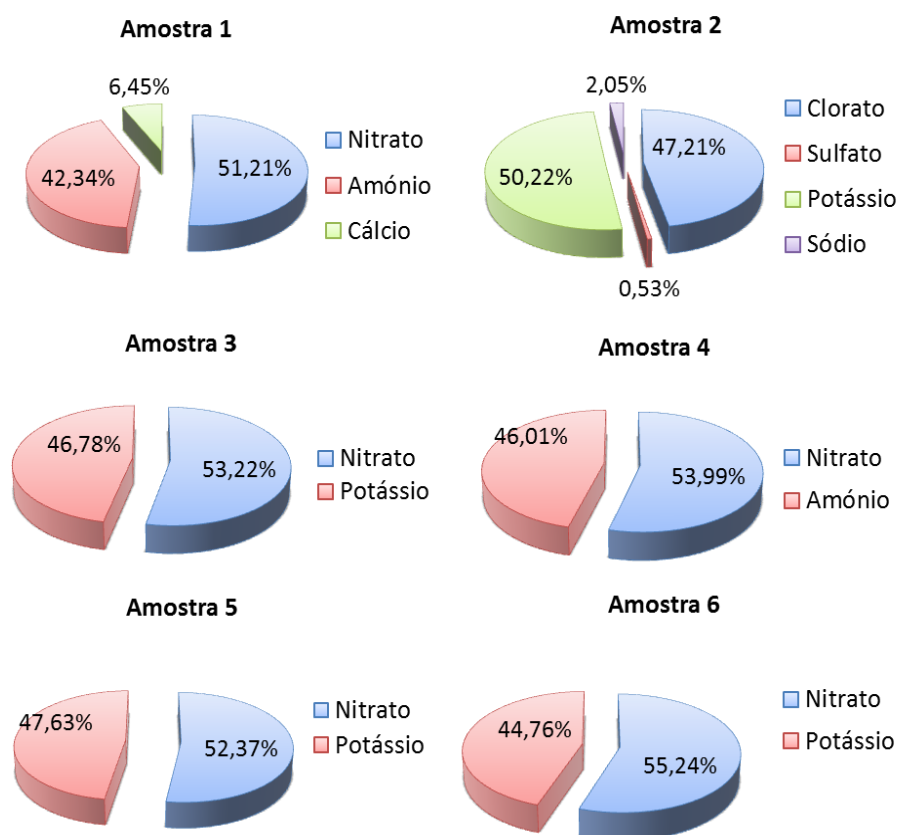


Fig.22 – Representação gráfica das percentagens de moles de cargas associadas a cada espécie constituintes das amostras em estudo.

Depois de quantificados todos os analitos aniónicos e catiónicos presentes nas amostras, segue-se a determinação do balanço iónico. O objectivo da determinação deste balanço é analisar as proporções estequiométricas dos iões em solução e identificar quais os compostos que constituem a amostra sólida. Com os resultados obtidos foram estudadas possíveis combinações de aniões e catiões e o seu balanço iónico baseou-se no estudo de compatibilidade descrito anteriormente (equação 46) recorrendo aos dados da tabela 43.

Como se vê na representação gráfica (Fig. 22), a amostra 1 é constituída maioritariamente por nitrato e amónio, apresentando também uma pequena percentagem de cálcio. Após o balanço global iónico, considerando a incerteza das determinações, conclui-se que a amostra 1 se trata de um explosivo à base de nitrato de amónio e de nitrato de cálcio.

Relativamente à amostra 2, pelo gráfico é possível ver que esta é constituída à base de clorato e de potássio, tendo também uma pequena percentagem de sulfato e sódio. Este caso é um pouco mais complicado de interpretar. Testou-se a hipótese de a amostra ser composta à base de clorato de sódio e de clorato de potássio, que foi confirmada pelo estudo de compatibilidade metrológica. Relativamente ao sulfato, para perceber qual é o seu papel na composição da amostra, deve-se recorrer a uma técnica de análise complementar.

Pelas representações gráficas das amostras 3, 5 e 6, verificamos que estas são compostas à base de nitrato e de potássio. Foi testada a qualidade do balanço iónico que permitiu garantir que se tratam de amostras de explosivos à base de nitrato de potássio. A proporção dos analitos presentes na amostra 4 é semelhante às anteriores, sendo no entanto a sua composição à base de nitrato de amónio.

4 CONCLUSÕES

A identificação do tipo de explosivo inorgânico com base na informação sobre a presença dos diversos iões que o constituem, não é conclusiva relativamente à composição da amostra sólida. De forma a melhorar a resposta aos exames requisitados, foi desenvolvido um método de análise quantitativa, juntamente com a optimização do método qualitativo usado, onde, quantificando todos os analitos em solução, é possível determinar o seu balanço iónico em moles de cargas e, através da avaliação deste, inferir sobre a composição global da amostra.

A optimização do método qualitativo foi realizada através da alteração das condições cromatográficas do método original de modo a obter uma melhor resolução dos picos. Tanto no caso dos aniões como dos cатиões isso foi conseguido. O controlo da qualidade baseia-se na comparação dos tempos de retenção de amostras e padrões injectados em condições de repetibilidade, com o limite de repetibilidade dos tempos de retenção obtidos durante a validação do método. Foi verificado que, essencialmente na análise dos aniões, o t_r dos analitos varia consideravelmente com a sua concentração. Desse modo, para garantir a qualidade da identificação dos analitos, é recomendado que a concentração presente numa amostra esteja incluída no intervalo de concentração entre os padrões de controlo estudados durante a validação.

O método de análise quantitativa foi desenvolvido considerando uma gama de trabalho adequada ao objectivo do ensaio e a linearidade da resposta instrumental em função da concentração. O sinal instrumental é directamente proporcional à concentração dos analitos nas gamas estudadas, tendo-se verificado nos três métodos usados (quantificação do bário, dos restantes cатиões e quantificação de aniões) a adequação do modelo de regressão linear escolhido para descrever a resposta instrumental. Os parâmetros de regressão estimados, em particular as ordenadas na origem e o declive, não são estáveis ao longo de um período de tempo alargado indicando a necessidade da

calibração diária do cromatógrafo. Quanto à estabilidade da composição dos padrões da curva, provou-se que estes são estáveis durante pelo menos dois meses, excepto o fluoreto que mostrou não ser estável. Relativamente à incerteza inerente ao processo de quantificação, esta demonstrou ser adequada ao uso, sendo a componente maioritária a associada à interpolação do sinal na curva de calibração. A qualidade do desempenho de medição quantitativa validado foi verificada através da análise de um material de referência certificado. O controlo da qualidade interno é realizado através da realização de ensaios brancos, ensaios duplicados, avaliação do coeficiente de correlação linear da calibração analítica e da análise de materiais de referência certificados

A preparação dos extractos dos explosivos e mais concretamente a sua diluição também mostrou ser um passo determinante principalmente no caso da análise dos catiões, onde o pH da solução amostra analisada deve estar dentro do intervalo recomendado da coluna. Caso contrário, foi verificado que os resultados obtidos são afectados significativamente.

A análise de amostras reais permitiu testar o esquema de análise proposto, incluindo o programa de controlo da qualidade interno, e os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo-se conseguido, em grande parte dos casos, identificar a composição das amostras em causa. Demonstrou-se assim que a estratégia desenvolvida garante uma identificação e quantificação fidedigna da composição iónica da fracção solúvel em água de explosivos inorgânicos, incluindo a incerteza da medição necessária à avaliação do balanço iónico.

A metodologia desenvolvida mostrou ser muito útil neste tipo de análise, na medida em que permite que sejam reportados resultados mais completos e dessa forma ajudar a investigação criminal. O conhecimento das proporções dos diversos constituintes do explosivo permite relacionar a composição determinada com algumas marcas ou organizações criminais, pois estas acabam por seguir as suas próprias “receitas”. No entanto, e como foi verificado, em alguns casos é útil recorrer uma técnica complementar como o caso do FTIR ou XRD, que dando informação adicional sobre a composição e estrutura dos compostos presentes na amostra, ultrapassam algumas limitações da IC permitindo uma melhor identificação da composição do explosivo em causa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhavan, J.** (1998). *The Chemistry of Explosives*. Manchester: The Royal Society of Chemistry.
- Beveridge, A.** (1998). *Forensic Identification of Explosives*. London: Taylor and Francis.
- Byall, E.B., D. Ph.** (2001). Explosives Report - *Detection and Characterization Of Explosives and Explosive Residu*. 13th INTERPOL Forensic Science Symposium, Lyon, France.
- Daniel, F.** (2000). *Manual de Utilização de Explosivos em Explorações a Céu Aberto*. Divisão de Minas e Pedreiras do Instituto Geológico e Mineiro. Versão *Online* no site do INETI: http://e-Geo.ineti.pt/geociencias/edicoes_online/diversos/explosivos/indice.htm.
- Dicinoski, G.W., Shellie, R.A., & Haddad, P.R.** (2006). Forensic Identification of Inorganic Explosives by Ion Chromatography. *Analytical Letters*, 39:4, 639-657.
- CITAC, Eurachem Guide.** (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods.
- CITAC, Eurachem Guide.** (2000). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.
- Hargadon, K.A., & McCord, B.R.** (1992). Explosive Residue Analysis by Capillary Electrophoresis and Ion Chromatography. *Journal of Chromatography*, 602, 241-247.
- Harris, D.C.** (1996). *Quantitative Chemical Analysis* (4ª ed.). Nova Iorque: W. H. Freeman and company.
- Hutchinson, J.P, Johns, C., Dicinoski, G.W., & Haddad, P.R.** (2008). Identification of Improvised Inorganic Explosives Devices by Analysis of Postblast Residues Using Ion Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- INMETRO**, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. (2003). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*.
- IPAC, Guia IPAC OGC001** (2007). Guia para a Quantificação de Incertezas em Ensaio Químicos.

- Johns, C.**, Shellie, R.A., Potter, O.G., O'Reilly, J.W., Hutchinson, J.P., Guijt, R.M., Breadmore, M.C., Hilder, E.F., Dicinoski, G.W., & Haddad, P.R. (2008). Identification of Homemade Inorganic Explosives by Ion Chromatographic Analysis of Post-blast Residues. *Journal of Chromatography*, 1182, 205-214.
- Martins, A.R.** (1997). *Segurança na Aplicação de Explosivos na Indústria de Construção Cível*. Tese de Mestrado. Lisboa: Instituto Superior Técnico.
- McCord, B.R.**, Hargadon, K.A., Hall, K.E., & Burmeister, S.G. (1994). Forensic Analysis of Explosives Using Ion Chromatography Methods. *Analytical Chimica Acta*, 288, 43-56.
- Meng, H.**, Wang, T., Guo, B., Hashi, Y., Guo, C., & Lin, J. (2008). Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations in Explosive Residues by Ion Chromatography. *Talanta*, 76, 241-245.
- Miller, J.N.**, Miller, J.C. (2005) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. England: Pearson Education Limited.
- Miller, M.L.**, Doyle, J.M., Lee, R.A., & Gillette, R. (2001) Analysis of Anions by Capillary Electrophoresis and Ion Chromatography for Forensic Applications. *Forensic Science Communications*, 3(2).
- Schäfer, H.**, Läubli, M., & Dörig, R. (1996). *Ion Chromatography Monograph*.
- STRIEE**, Secção de Treino de Reconhecimento e Inactivação de Engenheiros Explosivos. (2003). Centro de Treino de Sobrevivência da Força Aérea.
- Silva, R.J.N.B.** (2004). *Modelação do Desempenho de Métodos Analíticos Complexos*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências.
- Skoog, D.A.**, West, D.M., & Holler, F.J. (1992). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (6ª ed.). EUA: Saunders College Publisher.
- Ramalho, F.J.** (2004) *Manual de Aplicação de Explosivos*. Direcção Nacional da PSP.
- Ribani, M.**, Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., & Melo, L.F.C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Electroforéticos. *Quim. Nova*, 27(5), 771-780.

- Tyrrell, E.,** Dicinoski, G.W., Hilder, E.F., Shelie, R.A., Breadmore, M.C., Pohl, C.A., & Haddad, P.R. (2011) Coupled Reversed-Phase and Ion Chromatographic System for the Simultaneous Identification of Inorganic and Organic Explosives. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3007-3012.
- Trullols, E.,** Ruisánchez, I., & Rius, F.X. (2004). Validation of qualitative analytical methods. *Trends in analytical chemistry*, 23, 3.
- VIM** - Guia ISO/IEC 99 (2008) *Vocabulário Internacional de Metrologia*. Instituto Português da Qualidade.
- Wisser, M.E., & Coplen, T.B.** (2011). Atomic weights of the elements. *Pure Appl. Chem.*, 2 (83), 359-396.
- Weiss, J.** (2004). *Handbook of Ion Chromatography* (3ª ed.). Germany: WILEY-VCH.
- Yinon, J., & Zitrin, S.** (1993). *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosives*. England: John Wiley & Sons Ltd.

ANEXOS

Componentes da repetibilidade e calibração do material usado necessárias para o cálculo das incertezas associadas a volume.

Tabela A.I.1 – Componentes de repetibilidade e tolerância dos material de vidro usado durante o trabalho experimental.

Material	Repetibilidade	Tolerância
Balão 10 mL	0,01418	0,025
Balão 50 mL	0,03715	0,06
Balão 100 mL	0,04277	0,1
Pipeta 5 mL	0,00753	0,03
Pipeta 20 mL	0,03127	0,06
Pipeta 25 mL	0,04225	0,10
Pipeta Volumétrica 25 mL	0,02172	0,03

Tabela A.I.2 - Componentes de repetibilidade e erro relativo associados às micropipetas automáticas usadas durante o trabalho experimental.

Micropipeta Automática	Repetibilidade (mL)	Erro relativo
100-1000 μ L	0,00090	0,009
20-200 μ L	0,00048	0,012